

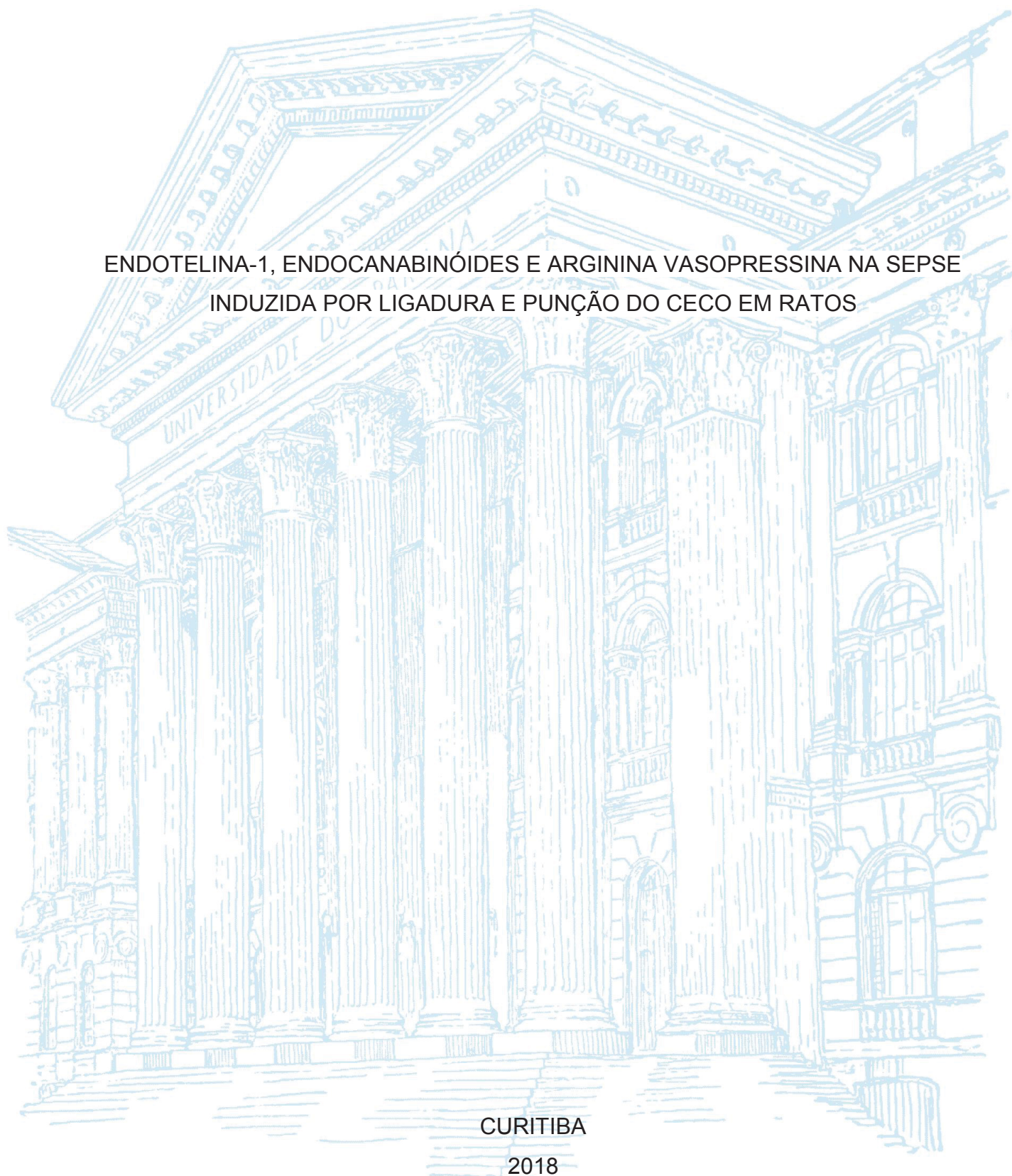
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MARIANE CRISTINA GUTTERVILL LEITE

ENDOTELINA-1, ENDOCANABINÓIDES E ARGININA VASOPRESSINA NA SEPSE
INDUZIDA POR LIGADURA E PUNÇÃO DO CECO EM RATOS

CURITIBA

2018



MARIANE CRISTINA GUTTERVILL LEITE

ENDOTELINA-1, ENDOCANABINÓIDES E ARGININA VASOPRESSINA NA SEPSE
INDUZIDA POR LIGADURA E PUNÇÃO DO CECO EM RATOS

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Aleksander Roberto Zampronio

CURITIBA

2018

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas.
(Rosilei Vilas Boas – CRB/9-939).

Leite, Mariane Cristina Gutierrez.

Endotelina-1, endocanabinóides e arginina vasopressina na sepse induzida por ligadura e punção do ceco em ratos. / Mariane Cristina Gutierrez Leite. – Curitiba, 2018.

106 f. : il. ; 30cm.

Orientador: Aleksander Roberto Zamprônio.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

1. Sepse. 2. Canabinóides. 3. Arginina. 4. Endotelinas I. Título. II. Zamprônio, Aleksander Roberto. III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

CDD (20. ed.) 616.944



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO FARMACOLOGIA

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em FARMACOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **MARIANE CRISTINA GUTTERVILL LEITE** intitulada: **Endotelina-1, endocanabíóides e arglnina vasopressina na sepse induzida por ligadura e punção do ceco em ratos**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua Aprovação no rito de defesa.


A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 30 de Novembro de 2018.


ALEKSANDER ROBERTO ZAMPRONIO
Presidente da Banca Examinadora


ALEXANDRA ACCO
Avaliador Interno (UFPR)


ADRIANA FROHLICH MERCADANTE
Avaliador Externo (UFPR)


DENIS DE MELO SOARES
Avaliador Externo (UFBA)


CRISTINA APARECIDA JARK STERN
Avaliador Interno (UFPR).



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO FARMACOLOGIA

ATA Nº

ATA DE SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE DOUTORADO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM FARMACOLOGIA

No dia trinta de novembro de dois mil e dezoito às 14:00 horas, na sala Anfiteatro do Departamento, Departamento de Farmacologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, foram instalados os trabalhos de arguição da doutoranda **MARIANE CRISTINA GUTTERVILL LEITE** para a Defesa Pública de sua tese intitulada **Endotelina-1, endocanabíóides e arginina vasopressina na sepse induzida por ligadura e punção do ceco em ratos**. A Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em FARMACOLOGIA da Universidade Federal do Paraná, foi constituída pelos seguintes Membros: ALEKSANDER ROBERTO ZAMPRONIO (UFPR), ALEXANDRA ACCO (UFPR), ADRIANA FROHLICH MERCADANTE (UFPR), DENIS DE MELO SOARES (UFBA), CRISTINA APARECIDA JARK STERN (UFPR). Dando início à sessão, a presidência passou a palavra a discente, para que a mesma expusesse seu trabalho aos presentes. Em seguida, a presidência passou a palavra a cada um dos Examinadores, para suas respectivas arguições. A aluna respondeu a cada um dos arguidores. A presidência retomou a palavra para suas considerações finais. A Banca Examinadora, então, reuniu-se e, após a discussão de suas avaliações, decidiu-se pela Aprovação da aluna. A doutoranda foi convidada a ingressar novamente na sala, bem como os demais assistentes, após o que a presidência fez a leitura do Parecer da Banca Examinadora. A aprovação no rito de defesa deverá ser homologada pelo Colegiado do programa, mediante o atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca dentro dos prazos regimentais do programa. A outorga do título de doutor está condicionada ao atendimento de todos os requisitos e prazos determinados no regimento do Programa de Pós-Graduação. Nada mais havendo a tratar a presidência deu por encerrada a sessão, da qual eu, ALEKSANDER ROBERTO ZAMPRONIO, lavrei a presente ata, que vai assinada por mim e pelos membros da Comissão Examinadora.

Curitiba, 30 de Novembro de 2018.


ALEKSANDER ROBERTO ZAMPRONIO
Presidente da Banca Examinadora


ALEXANDRA ACCO
Avaliador Interno (UFPR)


ADRIANA FROHLICH MERCADANTE
Avaliador Externo (UFPR)


DENIS DE MELO SOARES
Avaliador Externo (UFBA)


CRISTINA APARECIDA JARK STERN
Avaliador Interno (UFPR)

Dedico este trabalho ao meu marido, Aleksander, pelo companheirismo dedicado durante esta jornada e ao meus pais, João Batista e Maria Josefa e ao meu irmão, João, por todo o amor e carinho.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer meu orientador, Dr. Aleksander Zamprônio, por sempre acreditar e me nortear para realização do trabalho, por todos os ensinamentos e valores que me transmitiu e por sempre exigir o melhor de mim. Por ser um exemplo de pesquisador e professor! E além de tudo, amigo!

Ao meu orientador durante o período de doutorado sanduíche na Universidade de Calgary, Dr. Quentin Pittman, por ter me recebido tão bem, pelos ensinamentos de escrita, pesquisa e bancada durante o desenvolvimento e execução do projeto, por sempre ter tido um tempo para me ouvir e conversar, por abrir as portas e por ter se mostrado sempre amigo!

Ao meu marido, Aleksander, por estar presente em todos os momentos dessa jornada, por ter sempre me motivado, pela paciência, compreensão e ajuda dedicada ao meu trabalho. Sem você eu não teria conseguido! Te amo!

Ao meus pais, João Batista e Maria Josefa, por sempre me apoiarem e pelo amor e carinho dedicado durante essa jornada. E ao meu irmão, João Batista Jr, pela companhia, pelo apoio e por ser meu amigo. Amo vocês! É um privilégio ter uma família como a minha!

A todos os pesquisadores do Laboratório de Dor, Inflamação e Febre. Ao meu amigo, Luis Alexandre, muitas foram as conversas, os experimentos, seminários, desafios, e experiências trocadas. Muito obrigada pela companhia e pela amizade! As amigas, Isabella, Juliana, Letícia, Débora, Felipe e Maycon pela amizade, companhia e trocas de experiências que foram muito importantes durante esse período! Ao meu amigo Diego pela valiosa ajuda nos experimentos!

As dedicadas alunas de iniciação científica, Dunia e Fernanda! Foi ótimo trabalhar e compartilhar com vocês as experiências do doutorado!

Aos amigos e pesquisadores da Universidade de Calgary, que me ajudaram muito durante o doutorado sanduíche, Shaona, Vienna, Daniel, Justin, Vimal, Robert, Mio e Tara! Não existem palavras para agradecer, e descrever o quão importante vocês foram!

Ao meu professor de Farmacologia, da Univille Eduardo Manoel, por sempre inspirar todos os seus alunos!

A professora Dra Camila Almeida, da UFABC, pelo empréstimo da termocâmara e pelas orientações de uso e auxílio na interpretação de resultados!

Ao professor, Dr. José Eduardo, da UFSC, por abrir as portas de seu laboratório para que pudéssemos realizar os experimentos de reatividade vascular. A Priscila, por prontamente me auxiliar na execução dos experimentos, metodologia e interpretação dos resultados! Muito obrigada!

A prof. Dra Patrícia Dalzoto, do departamento de Patologia, da UFPR, por prontamente me ensinar a fazer a contagem de bactérias e ao prof. Dr. José Ederaldo Queiroz Telles, da UFPR pela ajuda na histologia.

Ao Dr. Matthew Hill, da Universidade de Calgary, por tornar possível a realização dos experimentos do doutorado sanduíche!

Aos professores, Dra. Alexandra Acco, Dr. Denis Soares, Dra Cristina Stern e Dra Adriana Mercadante, por comporem a banca examinadora, e pelas excelentes sugestões e correções.

As funcionárias do biotério da UFPR, Luana, Izelen e Gilmara pelo bom atendimento e pelo fornecimento dos animais.

A Universidade do Contestado, aos meus alunos, e a Dra Fabiana Ludka, por me proporcionarem a experiência de ser professora de Farmacologia!

A minha amiga, Bruna Soley, pela amizade, pelas conversas no corredor, pelos empréstimos de matérias de laboratório, muito obrigada!

A minha amiga, Paola, por estar sempre pronta a me ouvir, pelas longas conversas e trocas! Obrigada pela amizade!

A todos os alunos, amigos, professores e funcionários do departamento da Universidade Federal do Paraná, e Universidade de Calgary, que, de uma forma ou de outra, contribuíram para a realização desta pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior pela bolsa de doutorado concedida.

Aos animais meu respeito e gratidão.

A todos que, de algum modo, contribuíram para a execução deste trabalho, o meu muito obrigado.

“O importante é não parar de questionar”.

Albert Einstein

“Um pouco de ciência nos afasta de Deus. Muito, nos aproxima”.

Louis Pasteur

RESUMO

A sepse representa uma resposta imune desregulada à infecção, com altas taxas de mortalidade e pode progredir para choque séptico. Mostramos anteriormente que o tratamento por via oral com o antagonista do receptor canabinóide CB₁, rimonabanto, reduziu as taxas de mortalidade em animais com sepse induzida por ligadura e punção do ceco (CLP). Essa melhora na taxa de sobrevivência parece estar relacionada a um aumento nos níveis de arginina vasopressina (AVP) circulantes 12 h após a CLP. O presente estudo investigou os efeitos periféricos do tratamento com rimonabanto na disfunção de órgãos, parâmetros hematológicos e reatividade vascular em ratos *Wistar* machos com sepse induzida por CLP. Além disso, o presente estudo buscou compreender o efeito do bloqueio central do sistema endocanabinóide e do sistema endotelinérgico durante a sepse. Para este fim, avaliamos o efeito do bloqueio do receptor CB₁ na taxa de sobrevivência de ratos submetidos à sepse por CLP, o efeito do bloqueio do receptor CB₁ e o bloqueio do receptor ET_A na temperatura da cauda em ratos com sepse, o efeito da sepse nos níveis de anandamida (AEA) e 2 araquidonilglicerol (2-AG) no hipotálamo, o efeito do antagonista de receptor ET_A BQ123, nos níveis de endocanabinóides (eCB) no hipotálamo em ratos sépticos e o efeito do bloqueio do receptor CB₁, com AM 251 na variação da temperatura da cauda após a administração de AVP. Os resultados que avaliaram o efeito periférico do bloqueio dos receptores CB₁, demonstraram que o tratamento com rimonabanto por via oral (10 mg/kg, 4 h após CLP) aboliu o aumento nos níveis plasmáticos de lactato, lactato desidrogenase (LDH), glicose e creatinina quinase MB (CK-MB) sem alterar os parâmetros hematológicos, como leucopenia e redução da contagem de plaquetas. O tratamento com rimonabanto também não alterou o aumento dos níveis de nitrato/nitrito (NO_x) induzido pela sepse, mas reduziu a vasoconstrição induzida pela sepse na artéria da cauda. Ainda, o tratamento com rimonabanto também atenuou a hiperreatividade à AVP sem afetar a hiporresponsividade à fenilefrina em anéis aórticos. O bloqueio, no sistema nervoso central, dos receptores CB₁ utilizando os antagonistas de receptor CB₁, o rimonabanto e o AM 251 preveniram a mortalidade induzida por CLP em ratos. Além disso, a CLP promoveu uma diminuição na temperatura da cauda dos ratos, e esta diminuição foi abolida após a administração do

antagonista de receptor CB₁, AM251 e após a administração de antagonista de receptor ET_A, BQ123. A sepse aumentou os níveis de AEA no hipotálamo 6 h após a cirurgia, mas não alterou os níveis de 2-AG, e a administração intracerebroventricular (i.c.v.) de BQ123, aboliu esse aumento. Além disso, a sepse induziu uma hiperresponsividade (vasoconstrição) da artéria caudal à injeção i.v. de AVP 24 h após a cirurgia que foi revertida pelo tratamento i.c.v. com AM 251 4 e 8 h após a CLP. Em conjunto, esses resultados sugerem que o rimonabanto reduz a disfunção de órgãos durante a sepse, e esse efeito pode estar relacionado à sinalização de AVP nos vasos sanguíneos. Este efeito pode ter contribuído para a maior taxa de sobrevivência em animais sépticos tratados com agonista inverso/antagonista de receptor CB₁. Além disso, é possível sugerir que o bloqueio dos receptores CB₁ e ET_A no sistema nervoso central (SNC), poderia ser benéfico durante a sepse e poderia representar um novo alvo para o tratamento da sepse.

Palavras-chaves: Sepse. Endocanabinóides. Arginina-vasopressina. Endotelina-1.

ABSTRACT

Sepsis is a life-threatening condition with high mortality rates that is caused by dysregulation of the host response to infection. We have previously reported that treatment by oral route with the cannabinoid CB₁ receptor antagonist rimonabant reduced mortality rates in animals with sepsis that was induced by cecal ligation and puncture (CLP). This improvement in the survival rate appeared to be related to an increase in arginine vasopressin (AVP) circulating levels 12 h after CLP. The present study investigated the effects of rimonabant on organ dysfunction, hematologic parameters, and vascular reactivity in male Wistar rats with sepsis induced by CLP. In addition, the present study seeks to understand the effect of central blockade of the endocannabinoid system and endothelinergic system during sepsis. To this goal, we evaluated the effect of CB₁ receptor blockade on the survival rate of rats submitted to CLP-induced sepsis, the effect of CB₁ receptor blockade and ET_A receptor blockade on skin temperature in rats with sepsis, the effect of sepsis in the anandamide (AEA) and 2- araquidonilglycerol (2-AG) levels of the hypothalamus and the effect of the administration of BQ123, an ET_A receptor antagonist, at the levels of endocannabinoids (eCB) in the hypothalamus in septic rats and the effect of CB₁ receptor antagonist, AM 251 on tail temperature variation after AVP administration. Results that evaluated the peripheral effect of CB₁ receptor blockade demonstrated that the oral treatment with rimonabant (10 mg/kg, 4 h after CLP) abolished the increase in plasma levels of lactate, lactate dehydrogenase (LDH), glucose and creatinine kinase MB (CK-MB) with no alterations in the hematological parameters, such as: leucopenia and reduction in platelet count. Treatment with rimonabant did not alter the increase in nitrate/ nitrite (NO_x) levels induced by sepsis, but reduced vasoconstriction in the tail artery. In addition, treatment with rimonabant also attenuated hyperreactivity to AVP without affecting hyporesponsiveness to phenylephrine in aortic rings. The blockade of the CB₁ receptors in the central nervous system, using the CB₁ receptor antagonists rimonabant and AM 251 prevented CLP-induced mortality in rats. In addition, CLP promoted a decrease in rat skin temperature, and this decrease was abolished following administration of CB₁ receptor antagonist, AM251 and following administration of ET_A receptor antagonist, BQ123. Sepsis increased the levels of AEA in the hypothalamus 6 h

after surgery but did not alter 2-AG levels, and intracerebroventricular (i.c.v) administration of BQ123 abolished this increase. In addition, sepsis induced hyperresponsiveness (vasoconstriction) of the tail artery to the i.v. injection of AVP 24 h after the surgery that was abolished by the i.c.v. treatment with AM 251 4 and 8 h after CLP. Taken together, these results suggest that rimonabant reduces organ dysfunction during sepsis, and this effect may be related to AVP signaling in blood vessels. This effect may have contributed to the higher survival rate in septic animals treated with CB₁ receptor antagonist/inverse agonist. In addition, it is possible to suggest that the blockade of CB₁ and ET_A receptors in the central nervous system could be beneficial during sepsis and could represent a new target for the treatment of sepsis.

Keywords: Sepsis. Endocannabinoids. Arginine vasopressin. Endotelin-1.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Secreção axônica e dendrítica de AVP.....	16
Figura 2 - Representação esquemática da sequência de eventos proposta pelos autores.....	20
Figura 3 - Efeito do bloqueio do receptor CB ₁ sobre o número de unidades formadoras de colônia no exsudato peritoneal dos animais com sepse.....	37
Figura 4 - Efeito do bloqueio do receptor CB ₁ sobre os níveis plasmáticos de lactato e LDH em animais com sepse.....	39
Figura 5 - Efeito do bloqueio do receptor CB ₁ nos níveis de glicose e CK-MB em animais com sepse.....	41
Figura 6 - Efeito do bloqueio do receptor CB ₁ em parâmetros hematológicos em animais com sepse.....	43
Figura 7 - Efeito do bloqueio do receptor CB ₁ em parâmetros hematológicos em animais com sepse	45
Figura 8 - Efeito do bloqueio do receptor CB ₁ sobre os níveis plasmáticos de NOx em animais com sepse.....	46
Figura 9 - Efeito do bloqueio do receptor CB ₁ na temperatura da cauda em animais com sepse.....	48
Figura 10 - Efeito do bloqueio do receptor CB ₁ sobre a reatividade vascular ao KCL e à fenilfebrina em anéis de aorta.....	50
Figura 11 - Efeito do bloqueio do receptor CB ₁ na reatividade vascular a vasopressina em anéis de aorta.....	52
Figura 12 - Efeito da administração central de rimonabanto após a CLP sobre a taxa de sobrevivência dos animais.....	54
Figura 13 - Efeito da administração central de AM 251 após a CLP sobre a taxa de sobrevivência dos animais.....	56
Figura 14 - Efeito do bloqueio do receptor CB ₁ e do bloqueio do receptor ET _A na temperatura da cauda.....	58
Figura 15 - Efeito do bloqueio do receptor ET _A sobre os níveis de AEA e 2-AG no hipotálamo.....	61
Figura 16 - Efeito do bloqueio do receptor CB ₁ sobre o efeito da AVP na da temperatura da cauda.....	63

LISTA DE ABREVIATURAS E/OU SIGLAS

2-AG: 2-araquidonoilglicerol
AEA: N-araquidonoiletanolamina ou anandamida
ATP: trifosfato de adenosina
AMPC: - monofosfato cíclico de adenosina
AM251: antagonista de receptor CB₁
ANOVA: análise de variância
ATP: trifosfato de adenosina
AVP: arginina-vasopressina
BHE: barreira hematoencefálica
BQ 123: antagonista de receptor ET_A
BQ 788: antagonista de receptor ET_B
CB₁: receptor 1 de canabinóides
CB₂: receptor 2 de canabinóides
CEUA: Comitê de Ética para Uso de Animais
CFUs: unidades formadoras de colônias
CK-MB: creatinofosfo-quinase isoenzima MB
CLP: ligadura e punção do ceco
CMC: carboximetilcelulose
CONCEA: Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CSF: fluido cérebro espinhal
DAG: diacilglicerol
DAG-lipase: sn-1-diacilglicerol lipase
DGL: diacilglicerol lipase 14
DMSO: sulfóxido de dimetilo
e.p.m.: erro padrão da média
eCB: endocanabinóides
EDTA: ácido etilenodiaminotetracético disódico
ET: endotelinas
ET-1: Endotelina-1
ET-2: endotelina-2
ET-3: endotelina-3
ET_A: receptor para endotelina tipo A

ET_B: receptor para endotelina tipo B
FAAH: *amida* de ácido graxo hidrolase
GABA: ácido gama-aminobutírico
IL 1 β : interleucina-1 β
IL-10: interleucina 10
IL- 6: interleucina 6
IP₃: inositol trifosfato
i.c.v.: intracerebroventricular
i.p.: intraperitoneal
LPS: lipopolissacarideo
LDH: lactato desidrogenase
KCl: cloreto de potássio
MAP quinase: proteína quinase ativada por mitógeno
MIP-2: proteína inflamatória macrofágica-2
N₂: nitrogênio
NF- κ B: fator de transcrição nuclear κ B
NOS: núcleo supra-óptico
NOx: nitrato/nitrito
NPV: núcleo paraventricular
NO: óxido nítrico
PA: pressão arterial
PBS: salina tamponada com fosfatos
PIP₂: fosfaditilinositol bifosfato
POA-AH: área pré-óptica do hipotálamo anterior
s.c.: subcutânea
SOFA: avaliação sequencial de dano ao órgão
SIRS: síndrome da resposta inflamatória sistêmica
SNC: sistema nervoso central
SR141716: antagonista do receptor CB₁
TNF- α : fator de necrose tumoral- α
UCI: unidade de cuidados intensivos
VASST: *Vasopressin and Septic Shock Trial*
V_{1A}: receptor de vasopressina 1_A
V_{1B}: receptor de vasopressina 1_B

V₂: receptor de vasopressina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Seps e as dificuldades em seu tratamento	1
1.2 O sistema endotelinérgico e sua relação com a seps	7
1.3 O sistema endocanabinoide e sua relação com a seps	11
1.4 AVP na seps	15
1.5 AVP, endocanabinóides, endotelinas e seps	19
2. JUSTIFICATIVA	22
3. OBJETIVOS	24
3.1 Objetivo Geral	24
3.2 Objetivos específicos	24
4. MATERIAIS E MÉTODOS	26
4.1. Animais	26
4.2 Drogas, reagentes e meio de cultura	26
4.3 Indução da seps: Modelo de ligadura e perfuração do ceco (CLP – <i>cecal ligation and puncture</i>)	27
4.4 Protocolos experimentais I	28
4.4.1 Determinação da contagem de bactérias no exsudato peritoneal	28
4.4.2 Determinação dos parâmetros hematológicos	29
4.4.3 Determinação dos níveis de biomarcadores de falência de órgãos	29
4.4.4 Determinação dos níveis plasmáticos de Nitrato/Nitrito (NOx)	30
4.4.5 Determinação da temperatura da cauda	30
4.4.6 Determinação da reatividade vascular	30
4.5 Protocolos experimentais II	31
4.5.1 Cirurgia para implantação de cânula no ventrículo lateral	32
4.5.2 Determinação da taxa de sobrevivida	33
4.5.3 Determinação da temperatura da cauda	33

4.5.4 Determinação dos níveis de endocanabinóides no hipotálamo	34
4.6 Análise estatística	35
5. RESULTADOS	36
5.1.1 Efeito da administração periférica de antagonista de receptor CB ₁ , rimonabanto sobre a contagem de bactérias em animais com sepse	36
5.1.2 Efeito da administração periférica de antagonista de receptor CB ₁ , rimonabanto, sobre a dosagem de lactato e LDH em animais com sepse	38
5.1.4 Efeito da administração periférica de antagonista de receptor CB ₁ , rimonabanto, sobre a contagem de leucócitos em animais com sepse	42
5.1.5 Efeito da administração periférica de antagonista de receptor CB ₁ , rimonabanto, sobre a determinação de parâmetros hematológicos em animais com sepse	44
5.1.6 Efeito da administração periférica de antagonista de receptor CB ₁ , rimonabanto, na determinação dos níveis de NOx em animais com sepse	46
5.1.7 Efeito da administração periférica de antagonista de receptor CB ₁ , rimonabanto, sobre a temperatura da cauda em animais com sepse	47
5.1.8 Efeito da administração periférica de antagonista de receptor CB ₁ , rimonabanto, sobre a reatividade vascular ao KCl ou a fenilefrina em animais com sepse	49
5.1.9 Efeito da administração periférica de antagonista de receptor CB ₁ , rimonabanto, sobre a reatividade vascular à AVP em animais com sepse	51
5.2.1 Efeito da administração central de antagonista de receptor CB ₁ , rimonabanto, sobre a taxa de sobrevivência em animais com sepse	53
5.2.2 Efeito da administração central de antagonista de receptor CB ₁ , AM 251, sobre a taxa de sobrevivência em animais com sepse	55
5.2.3 Efeito da administração central de antagonista de receptor CB ₁ , AM 251, e de antagonista de receptor ET _A , BQ 123 na temperatura da cauda em animais com sepse	57

5.2.4 Efeito da administração central de antagonista de receptor ET _A , BQ 123, na dosagem de endocanabinóides em animais com sepse.....	60
6. DISCUSSÃO	64
7. CONCLUSÃO	76
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS	77
REFERÊNCIAS.....	78
APÊNDICE 1 - SOLUÇÕES E REAGENTES.....	96
APÊNDICE 2 - SOFA.....	99

1. INTRODUÇÃO

1.1 Seps e as dificuldades em seu tratamento

A seps é definida como uma disfunção orgânica na qual há risco de vida, causada por uma resposta sistêmica desregulada do hospedeiro a uma infecção (Singer *et al.*, 2016). Esse novo conceito, definido em 2016, enfatiza uma resposta não homeostática a uma infecção com potencial letalidade e necessidade de diagnóstico urgente. Mesmo um grau modesto de disfunção orgânica, associada a infecção, aumenta o risco de mortalidade em 10%. Portanto, o diagnóstico precisa ser rápido e apropriado (Singer *et al.*, 2016). Já o choque séptico é definido como um estado de falência circulatória aguda, no qual as anormalidades no metabolismo celular e circulatório são profundas o suficiente para aumentar ainda mais a taxa de mortalidade (Levy *et al.*, 2003).

Existem vários desafios importantes na tentativa de melhorar os cuidados com a seps. Estes incluem estratégias para assegurar a identificação e um diagnóstico precoce e preciso, estratégias para prever os resultados e estratificar os pacientes, bem como desenvolver novos tratamentos e estratégias de tratamento, os quais não existem no mercado no momento (Daniel & Lehmann, 2017).

Anualmente, a seps é responsável por 200.000 óbitos e um gasto de 14 a 16 bilhões de dólares nos Estados Unidos da América. As opções terapêuticas para o tratamento do choque séptico são limitadas e a taxa de mortalidade está entre 15 - 50% (Iwashyna *et al.*, 2010; Gaieski *et al.*, 2013; Zhou *et al.*, 2015).

Por mais de duas décadas, a seps foi definida simplesmente como uma infecção microbiana que produz febre (ou hipotermia), taquicardia, taquipneia e alterações leucocitárias no sangue. Atualmente, a seps está sendo cada vez mais considerada uma resposta inflamatória e imunológica sistêmica desregulada à invasão microbiana, que produz lesão de órgãos. O choque séptico permanece definido como seps com hiperlactatemia e hipotensão concomitante que requer terapia vasopressora (Hotchkiss *et al.*, 2017).

Não há um biomarcador que pode diagnosticar definitivamente a sepse ou prever seu resultado clínico, devido à sua complexidade (Hotchkiss *et al.*, 2017). Contudo, a hiperlactemia continua sendo um excelente marcador prognóstico bem como um componente primordial para uma linha de conduta diagnóstica e terapêutica sólida em cuidados intensivos (Levy, 2006), uma vez que os níveis plasmáticos de lactato estão elevados em pacientes com sepse ou choque séptico (Revelly *et al.*, 2005). De acordo com um estudo de Kahn, pacientes que apresentaram níveis plasmáticos de lactato > 4 mmol/l associado a hipotensão tiveram uma taxa de mortalidade de 44,5% enquanto que pacientes com níveis plasmáticos de lactato de 2 mmol/l sem apresentar hipotensão tiveram uma taxa de mortalidade de 23,1%. Deste modo, conclui-se que níveis plasmáticos elevados de lactato estão associados com um aumento da mortalidade hospitalar, e uma atenção especial deve ser dada a pacientes hipotensos com níveis plasmáticos de lactato > 4 mmol/l associado a hipotensão (Kahn, 2015). Além da medida de lactato ser uma ferramenta útil para a detecção de lesão orgânica, a liberação de lactato desidrogenase (LDH) na circulação é outro indicador de lesão de órgãos (Yang & Ma, 2016).

O metabolismo do lactato está intimamente relacionado ao metabolismo da glicose, pois, o aumento do *turnover* da glicose leva a um aumento na produção de lactato (Revelly *et al.*, 2005). O aumento dos níveis séricos de lactato em pacientes sépticos origina-se de duas maneiras possíveis: (a) da superprodução de ácido láctico quando o corpo regenera trifosfato de adenosina (ATP) na ausência de oxigênio (acidose láctica tipo 1) e (b) a remoção deficiente de ácido láctico por oxidação ou conversão em glicose (acidose láctica tipo 2) (Luft, 2001). Portanto uma vez que há alteração dos níveis de lactato, os níveis de glicose também podem estar alterados.

Outros achados laboratoriais comuns em pacientes com sepse são alterações na contagem de células brancas e trombocitopenia (Vanderschueren *et al.*, 2000; Tsiotou *et al.*, 2005). Os glóbulos brancos reagem muito rapidamente à resposta inflamatória induzida pela sepse e são, portanto, um importante marcador diagnóstico para monitorar a severidade da resposta sistêmica à sepse (Gabay & Kushner, 1999). Em pacientes com sepse, a contagem de leucócitos pode encontrar-se abaixo ou acima da normalidade (menor que 4,000 células/mm³ ou maior que 12,000 células/mm³) (Tsiotou *et al.*,

2005) . A leucopenia induzida por sepse é uma ocorrência frequente em recém-nascidos e está associada a desfechos desfavoráveis (Funke *et al.*, 2000). Possíveis origens da leucopenia podem ser o esgotamento dos progenitores da medula óssea, a maturação interrompida da linhagem comprometida de granulócitos ou o desequilíbrio entre o extravasamento e a produção de células (Quezado *et al.*, 2001).

No que se refere a trombocitopenia, esta apresenta uma incidência de 30 a 50% em pacientes severamente enfermos (Vanderschueren *et al.*, 2000). Uma baixa contagem de plaquetas tem sido associada a mortalidade em pacientes nas Unidades de Cuidado Intensivo (UCI) (Akca *et al.*, 2002; Shalansky *et al.*, 2002). Um estudo com foco em pacientes gravemente enfermos com sepse também relatou uma associação entre trombocitopenia e mortalidade (Sharma *et al.*, 2007). Recentemente, tem sido atribuído às plaquetas funções biológicas importantes, como a hemostasia. As plaquetas parecem limitar o crescimento bacteriano e a disseminação na sepse experimental, influenciam no recrutamento de leucócitos, na respostas de citocinas, na ativação do endotélio vascular, e no sistema de coagulação (Zeerleder *et al.*, 2005; Clark *et al.*, 2007; McDonald *et al.*, 2012; Boogaard *et al.*, 2015).

Além dessas alterações laboratoriais que são comumente observadas durante a sepse, um sistema biológico que é muito afetado pela sepse e pelo choque séptico é o sistema cardiovascular, pela ocorrência de hipotensão arterial e depressão da função miocárdica (Bone, 1991). A severidade da disfunção cardiovascular resulta de alterações na pressão arterial (PA), frequência cardíaca e do requerimento do uso de drogas vasoativas.

Muitos pacientes com sepse desenvolvem insuficiência cardíaca e circulatória, que é um resultado das anormalidades do metabolismo celular de oxigênio. Causas importantes de insuficiência circulatória incluem hipovolemia, que está associada com perdas externas e internas (formação de edema) e diminuição do tônus vascular, que está principalmente relacionada ao aumento dos níveis de óxido nítrico (NO) e peroxinitritos (Levy, 2010; Vincent & Backer, 2013). A produção excessiva de NO tem sido implicada na patogênese do choque séptico. Acredita-se que o NO seja uma das principais moléculas de sinalização que levam à vasodilatação resistente a vasopressores e à depressão miocárdica característica do choque séptico (Sheehan & Wong, 2002).

A sepse pode afetar não apenas o sistema cardiovascular, como todos os órgãos do corpo, provavelmente devido à grande liberação de citocinas e outros mediadores, como o NO que aparecem na circulação geral durante o início do distúrbio (Hotchkiss *et al.*, 2017). Além do choque cardiovascular, 5 tipos de disfunção orgânica predominam na sepse: neurológica (estado mental alterado), pulmonar (com hipoxemia), renal (oligúria e/ou aumento da creatinina), hematológica (diminuição da contagem de plaquetas) e hepática (hiperbilirrubinemia) (Lelubre & Vincent, 2018). O sistema nervoso central (SNC) é um dos primeiros sistemas a ser afetado pela sepse, porém o mecanismo pelo qual isso ocorre não está bem compreendido. As alterações que ocorrem no SNC, incluem: alteração na permeabilidade da barreira hematoencefálica (BHE) e isquemia cerebral resultante de uma redução no fluxo sanguíneo cerebral (Kadoi *et al.*, 1996; Papadopoulos *et al.*, 2000; Kadoi & Goto, 2004).

De acordo com Vincent e colaboradores (2006), a disfunção de um único órgão é rara na sepse, geralmente muitos órgãos são afetados e a taxa de mortalidade se correlaciona proporcionalmente com o número de órgãos afetados (Vincent *et al.*, 2006). Para a quantificação da disfunção de órgãos, uma ferramenta foi desenvolvida e pode ser utilizada, que se chama Avaliação Sequencial de Dano ao Órgão (SOFA, do inglês *Sequential Organ Failure Assesment*) (Vincent *et al.*, 2006). Embora o escore do SOFA tenha sido desenvolvido como uma medida da gravidade da disfunção orgânica, esse escore também tem valor prognóstico e tem sido usado para esse fim em muitos estudos. Os valores laboratoriais e os aspectos de tratamento necessários para o cálculo do escore SOFA podem ser obtidos facilmente a partir de informações computadorizadas, e essa pontuação agora pode ser obtida automaticamente em dispositivos móveis. É importante ressaltar que o cálculo dos vários elementos do escore SOFA não é necessário para o manejo clínico dos pacientes, sendo utilizado apenas para fins de pesquisa (Lelubre & Vincent, 2018). O objetivo primário na prevenção da disfunção de órgãos é restaurar e manter uma adequada entrega de oxigênio as células. O tratamento atual da sepse visa limitar o desenvolvimento de disfunção orgânica proporcionando controle rápido da infecção, estabilização hemodinâmica e suporte de órgãos, quando possível, para garantir a recuperação da função do órgão (Lelubre & Vincent, 2018).

A prevenção e o manejo da disfunção orgânica na sepse englobam três abordagens terapêuticas, das quais duas abordagens, a eliminação da infecção e a estabilização hemodinâmica para garantir perfusão microcirculatória adequada, são a base do tratamento atual da sepse. A terceira abordagem, terapias imunomoduladoras que são direcionadas a algumas das muitas vias envolvidas na disfunção celular e na resposta à sepse, é objeto de pesquisas em andamento (Delano & Ward, 2016; Lelubre & Vincent, 2018).

A segunda abordagem de tratamento citada acima, se trata do requerimento de vasopressores para a manutenção da PA em pacientes com choque séptico, que inclui hipotensão persistente e profundas anormalidades metabólicas e circulatórias (Singer *et al.*, 2016). Nos hospitais, a mortalidade por choque envolvendo o requerimento de vasopressores são causadas por hipotensão progressiva, apesar do suporte recomendado ser administrado ao paciente (De Backer *et al.*, 2010; Benbenishty *et al.*, 2011). Administrar altas doses de vasopressores no paciente gravemente doente e com falência múltipla de órgãos parece não ser um procedimento capaz de reverter o quadro de hipotensão. Porém, quando os pacientes recebem o tratamento precocemente a sobrevida é maior que 50% no choque séptico (Castro, et al., 2008) .

O principal objetivo do tratamento precoce durante o choque séptico é aumentar a PA para melhorar a perfusão tecidual de órgãos vitais. Um impedimento no alcance dessa meta é a resistência dos vasos aos agentes vasopressores, ou seja, a insensibilidade ou ausência de resposta a agentes vasopressores, que é chamado de hiporeatividade vascular (Landry & Oliver 2001; Holmes & Walley 2009).

Mesmo considerando esta condição, a administração de catecolaminas para tentar manter a PA e o débito cardíaco em níveis normais é uma abordagem terapêutica para o tratamento da sepse e da hipotensão (Ghosh *et al.*, 1993). Dentre as catecolaminas, norepinefrina, epinefrina e dopamina são os agentes utilizados, além da arginina-vasopressina (AVP) e análogos. De acordo com o *Guideline for Management of Severe Sepsis and Septic Shock*, a norepinefrina é o agente vasopressor de primeira escolha, a epinefrina e a AVP são recomendadas quando há a necessidade de um agente adicional para manter a PA (Rhodes *et al.*, 2017).

A AVP pode ser usada em associação com a norepinefrina com o objetivo de diminuir a dosagem desta catecolamina. A *Surviving Sepsis Campaign* sugere adicionar AVP (até 0,03 U/min) à norepinefrina com a intenção de elevar a PA do paciente ou para diminuir a dose de norepinefrina. A razão para o uso da AVP é que há uma relativa deficiência de AVP no choque séptico, de modo que a adição de AVP exógena restaura o tônus vascular, agindo em receptores não-adrenérgicos. Além disso, a AVP aumenta a PA, reduzindo as necessidades de norepinefrina e possivelmente tem efeitos favoráveis na produção de citocinas (Leone & Boyle, 2006; Russell *et al.*, 2013). Altas doses de AVP, superiores a 0,03-0,04 U/min, devem ser reservadas para terapia de resgate, ou seja, quando há falha no alcance da PA adequada com outros agentes (Dellinger *et al.*, 2013).

Um estudo que comparou a eficácia da AVP e da norepinefrina em pacientes com choque séptico moderado (definido como aqueles que recebiam uma baixa dose de norepinefrina, de 4 a 14 µg/min), avaliou a taxa de sobrevivência dos pacientes 28 dias após o início da infusão. O grupo de pacientes que recebeu AVP apresentou uma taxa de sobrevivência significativamente maior em relação ao grupo que recebeu norepinefrina (Russell *et al.*, 2008).

Em relação aos efeitos adversos, um estudo de Gordon e colaboradores, demonstrou menor ocorrência de fibrilação atrial no grupo que recebeu AVP em relação ao grupo controle (63,8 em comparação com 82,1%; $p = 0,0004$) e não houve diferença entre os grupos em relação às taxas de isquemia digital, isquemia mesentérica, hiponatremia ou infarto do miocárdio. Estes resultados sugerem, assim, que a AVP pode ser usada como agente de primeira linha durante o choque vasoplégico (Gordon *et al.*, 2016).

Com relação à dopamina, esta é um agente alternativo que deve ser utilizado no lugar da norepinefrina quando o paciente apresenta um pequeno risco de taquicardia ou um grande risco de bradicardia. E, por fim a fenilefrina, apenas é recomendada para o tratamento de sepse nas seguintes circunstâncias: (a) quando a noradrenalina está associada a arritmias graves, (b) quando sabe-se que o débito cardíaco é alto e a PA persistentemente baixa, ou (c) como terapia de resgate quando drogas inotrópicas/vasopressoras combinadas e baixas doses de AVP não conseguiram alcançar a PA desejada (Dellinger *et al.*, 2013; Levy, *et al.*, 2018). Porém há controvérsias em relação ao

agente de primeira escolha. Foi demonstrado, por exemplo, que a norepinefrina pode causar uma forte vasoconstrição na área esplâncnica, o que pode resultar em isquemia no trato gastrointestinal (Dellinger *et al.*, 2013).

Adicionalmente à administração de vasopressores, como catecolaminas ou AVP, é recomendada a administração de cristaloides, como fluido inicial de escolha na ressuscitação de sepse e choque séptico. Além disso, a administração de antimicrobianos intravenosos eficazes na primeira hora após o diagnóstico do choque séptico e sepse sem choque séptico deve ser um objetivo da terapia. A administração de corticosteroides, como a hidrocortisona, é recomendada apenas em casos de crianças com choque refratário fluídico, choque resistente a catecolaminas, ou deficiência adrenal (Dellinger *et al.*, 2013).

A alta taxa de mortalidade na sepse é atribuída às opções de tratamento inadequadas, que são limitadas e insatisfatórias (Burgdorff *et al.*, 2018). O tratamento ideal da sepse e do choque séptico deve ser um processo dinâmico e evolutivo, novas intervenções podem ser testadas e intervenções já estabelecidas podem sofrer modificações (Dellinger *et al.*, 2013).

Como pacientes com sepse apresentam níveis plasmáticos diminuídos de AVP (Landry & Oliver, 2001) e uma *downregulation* de receptores vasoconstritores (receptores de angiotensina, receptores adrenérgicos e receptores de AVP) (Bucher, 2004), o tratamento com vasoconstritores comuns após ressuscitação volêmica não reduz a mortalidade nem melhora a disfunção orgânica (Russel *et al.*, 2008). De acordo com Burgdorff e colaboradores (2018), uma nova opção terapêutica poderá ser a de interferir nas vias que afetam a expressão e a ação de receptores vasoconstritores (Burgdorff *et al.*, 2018). Portanto, novas estratégias de tratamento para a sepse e o choque séptico são necessárias e para isso é preciso compreender o funcionamento dos sistemas que são afetados durante a patofisiologia da sepse.

1.2 O sistema endotelinérgico e sua relação com a sepse

As endotelinas (ET), são uma família de peptídeos constituída por três isoformas: ET-1, ET-2 e ET-3. Esta família foi descoberta há quase trinta anos, atuam como potentes vasoconstritores em mamíferos (Inoue *et al.*, 1989) e agem

também como neuromoduladores que regulam sinapses glutamatérgicas no hipotálamo (Inoue *et al.*, 1989; Davenport, 2002).

Existem dois receptores para as ET: o receptor ET_A e o receptor ET_B. Ambos pertencem à superfamília de receptores acoplados à proteína G (Alexander *et al.*, 2008; Audet & Bouvier, 2012). O receptor ET_A e o receptor ET_B são farmacologicamente caracterizados pelas suas afinidades por esta família de peptídeos: o receptor ET_A tem afinidade pela ET-1 e ET-2 e 100 vezes menos afinidade pela ET-3, enquanto que o receptor ET_B apresenta afinidade similar para todos os ligantes (Yanagisawa *et al.*, 1988; Barton & Yanagisawa, 2008).

A ET-1 é um peptídeo que foi primeiramente descoberto em 1988 (Yanagisawa *et al.*, 1988; Inoue *et al.*, 1989), ao ser isolada e sequenciada de um sobrenadante de cultura de células endoteliais aórticas (Inoue *et al.*, 1989). É formada como um pró-peptídeo que é clivado em substância ativa por várias peptidases (Kotsovolis & Kallaras, 2010). A transcrição do gene da ET-1 é regulada pela síntese da pré-proendotelina-1, que contém 203 aminoácidos. Este pré-hormônio é então transformado pelas endopeptidases em *big*-endotelina-1, que é a forma circulante no plasma, mas que é funcionalmente inativa (Rubanyi GM1, 1994). As enzimas de conversão da ET-1, quinases e metaloproteases clivam a *big*-endotelina entre as posições 21 (triptofano) e 22 (valina), liberando a forma ativa da ET-1 com 21 aminoácidos (Yanagisawa *et al.*, 1988; Levin, 1995; Barton & Yanagisawa, 2008). No músculo liso vascular, a ligação da ET-1 no receptor ET_A desencadeia um aumento da concentração de cálcio intracelular, resultando numa potente vasoconstrição. Em contrapartida, por meio da ativação de receptores ET_B, a ET-1 pode promover vasodilatação por induzir a produção de NO. nas células endoteliais (Wagner, 1992; Bouallegue, 2007).

A ET-1 é produzida principalmente por células endoteliais, mas também em células musculares lisas vasculares, células da mucosa epitelial, macrófagos, mastócitos, células do miocárdio, células de Kupffer, células nervosas e células epiteliais da traqueia (Wanecek *et al.*, 2000). Além disso, estudos autorradiográficos de tecidos com ET marcada com radioisótopo em ratos demonstraram que locais específicos de ligação de alta afinidade para as ET estão distribuídos não apenas nos músculos lisos vasculares, mas também estão amplamente distribuídos em vários tecidos, incluindo o SNC (Koseki *et al.*,

1989). Resultados envolvendo imunoreatividade para ET-1 demonstraram sua presença em neurônios do córtex, estriado, amígdala, hipocampo, núcleo supraóptico e núcleo paraventricular do hipotálamo e glândula pituitária (Giaid *et al.*, 1991). A ET-1 é peptídeo neural predominante, exceto pela predominância da ET-3 na glândula pituitária posterior (Matsumoto *et al.*, 1989). Adicionalmente, o receptor ET_A foi imunohistoquimicamente identificado em neurônios magnocelulares do núcleo supraóptico e paraventricular no hipotálamo (Yamada & Kurakawa, 1998).

Logo após a descoberta da ET por Yanagisawa em 1988 (Yanagisawa *et al.*, 1988), foi mostrado sua participação na patogênese da sepse. Durante a sepse induzida por endotoxemia, que é um modelo de choque séptico induzido por LPS no qual há a presença de endotoxinas no sangue (Figueiredo *et al.*, 2012), os níveis plasmáticos de ET-1 estão aumentados em várias espécies (Kaszaki *et al.*, 1997; Kowalczyk *et al.*, 2015). Em ratos com sepse induzida por ligadura e punção do ceco (CLP), os níveis de ET-1 aumentam no SNC e no plasma 4-8 h após a indução da sepse (Sharma *et al.*, 1997). Esses níveis aumentados de ET-1 foram encontrados não apenas em modelos animais de sepse como a CLP (Kaddoura *et al.*, 1996; Kaszaki *et al.*, 1997) como também em pacientes humanos com sepse (Brauner, *et al.*, 2000). Além disso, a função de muitos órgãos (por exemplo, fígado, pulmão, coração ou rim) piora severamente após a infusão de ET-1 em modelos animais (Fenhammar *et al.*, 2011; Piechota-Polańczyk & Gorąca, 2012). O aumento dos níveis de ET-1 no plasma de pacientes com sepse, se correlaciona com a disfunção renal e a severidade da doença (Piechota *et al.*, 2007). Neste sentido, os autores sugerem um papel direto da ET-1 em contribuir com a disfunção de órgãos. Vários estudos relacionaram esses achados com o desfecho clínico desfavorável nos pacientes e demonstraram uma relação entre ET-1 e mortalidade na sepse ou choque séptico em adultos (Brauner *et al.*, 2000; Schuetz *et al.*, 2007; Lundberg *et al.*, 2016) e crianças (Papassotiriou, 2006; Rey *et al.*, 2013).

Ainda, no que se refere ao choque séptico, estudos demonstraram que a infusão sistêmica de ET-1 contribui para a disfunção de órgãos vitais como: fígado, pulmão, coração e rim (Fenhammar *et al.*, 2011; Kowalczyk *et al.*, 2015). Por outro lado, benefícios do bloqueio do receptor ET_A/ET_B tem sido demonstrados em experimentos animais durante a endotoxemia (Ross, 2012;

Bomberg *et al.*, 2013; Schuurin *et al.*, 2013), e o bloqueio de receptores ET_A, especificamente, melhorou a função do pulmão, coração, aorta (Rullman *et al.*, 2010) e rim (Mercier *et al.*, 2010). Deste modo, antagonistas não seletivos de receptores de ET como o bosentan e o tezosentan, e antagonistas seletivos, como o BQ 123 e o BQ 788, estão ganhando atenção no que diz respeito à melhora na progressão da sepse (Kowalczyk *et al.*, 2015).

Dentre as alterações discutidas anteriormente que a sepse pode causar, uma delas se relaciona à temperatura corporal, podendo estar presente uma reposta febril ou hipotermia, respostas que são controladas pelo hipotálamo. Em 1998, um estudo mostrou que injeções centrais de ET-1 aumentaram a temperatura corporal em ratos (Fabricio *et al.*, 1998). Durante a resposta febril induzida por lipopolissacarídeo (LPS), os níveis de ET-1 no líquido cefalorraquidiano, que eram indetectáveis em animais tratados com veículo, atingiram aproximadamente 22 fmol/mL após uma injeção de LPS (Fabricio *et al.*, 2005). Nestas condições, há evidências que sugerem que a ET-1 sintetizada no cérebro é importante para a resposta febril induzida por LPS e que parece agir ativando receptores ET_B (Fabricio *et al.*, 1998; Zampronio *et al.*, 2015).

Em resposta ao estresse, uma elevação dos níveis de ET-1 tem sido reportada e associada a uma variedade de outros processos infecciosos. Ações da ET-1 se associam com vasoespasmos, dano vascular, permeabilidade da BHE, remodelamento cardiovascular, e inflamação (McCarron *et al.*, 1993; Speciale *et al.*, 1998; Lin *et al.*, 2004; Bouallegue, 2007). Os níveis de ET-1 no fluido cérebro espinhal (CSF) também se encontram significativamente elevados em outras condições como por exemplo, em indivíduos com meningite bacteriana, que está associada com anormalidades no fluxo sanguíneo cerebral, atividades vasoativas e pró inflamatórias (Koedel *et al.*, 1997). Durante processos patológicos no SNC, devido as suas ações vasoativas, uma *upregulation* da ET-1 ocorre e causa um aumento da permeabilidade da BHE, ativação de astrócitos, aumento da expressão de células de adesão, bem como a ET-1 pode agir atuando na neurotransmissão (Ehrenreich *et al.*, 1990; McCarron *et al.*, 1993; Miller *et al.*, 1996; Schwarting *et al.*, 1996; Narushima *et al.*, 2003). Outra condição em que ocorre um aumento dos níveis de ET-1, é a malária, os níveis de ET-1 estão elevados no cérebro e plasma de pacientes com malária (Koedel *et al.*, 1997).

Adicionalmente, há estudos que investigaram uma relação entre o sistema endotelinérgico e endocanabinóide (eCB). Walter e colaboradores reportaram que astrócitos, quando receberam tratamento com ET-1, produziram 2-araquidonilglicerol (2-AG) em resposta ao aumento de cálcio intracelular (Walter *et al.*, 2002). Esse efeito da ET-1 na liberação de eicosanóides parece ser dependente de Ca^{2+} extracelular e inibido por antagonistas dos canais de Ca^{2+} sugerindo o envolvimento do influxo de Ca^{2+} em suas ações farmacológicas (Hirata *et al.*, 1988). Existem evidências de que a liberação de AVP durante a sepse é afetada tanto pelo sistema endotelinérgico e eCB, uma vez que a administração central de BQ 123 (antagonista de receptor ET_A e a administração periférica de Rimonabanto (antagonista de receptor CB_1) aumentaram os níveis plasmáticos de AVP na décima segunda hora após a indução da sepse (Leite-Avalca *et al.*, 2016). Assim, entender melhor a relação entre estes sistemas é de fundamental importância na busca por opções terapêuticas mais eficazes.

1.3 O sistema endocanabinoide e sua relação com a sepse

O sistema eCB é considerado um sistema neuromodulatório pois controla funções neuronais e imunes, e está amplamente distribuído por todo o SNC e em órgãos periféricos. É composto por dois eCB principais, a anandamida (AEA) e o 2-araquidonoiletanolamina (2-AG), e por seus receptores CB_1 e CB_2 (Mechoulam *et al.*, 1995). Estes eCB são ligantes endógenos dos receptores CB_1 e CB_2 , e tanto AEA quanto o 2-AG apresentam uma significativa afinidade pelos receptores embora ambos apresentem uma afinidade maior por receptores CB_1 (Pertwee & Ross, 2002; Pertwee *et al.*, 2010). Se encontram presentes em grandes concentrações no tecido cerebral, sendo que o 2-AG está presente no tecido cerebral em uma concentração 200 vezes maior que a AEA (Sugiura *et al.*, 2006).

Os dois receptores canabinóides que foram caracterizados, CB_1 e CB_2 pertencem à superfamília dos receptores de membrana ligados à proteína G (Matsuda *et al.*, 1990; Munro *et al.*, 1993). O receptor CB_1 é considerado o receptor acoplado a proteína G mais abundante no sistema nervoso central, em regiões como o hipotálamo, gânglios da base, amígdala, neocórtex, hipocampo, cerebelo, tronco encefálico e medula espinhal (Herkenham *et al.*, 1990). Podem

ser encontrados nos terminais dos neurônios centrais e também em terminais periféricos, onde os receptores CB₁ geralmente medeiam a inibição da liberação contínua de vários neurotransmissores excitatórios e inibitórios (Howlett, 2002; Pertwee *et al.*, 2010). Além disso, os eCB são liberados como mensageiros retrógrados por muitos neurônios, incluindo os neurônios magnocelulares hipotalâmicos. Os receptores CB₁ estão localizados nestes neurônios, bem como nos lóbulos ou na hipófise, o que ressalta a importância do papel dos eCB na produção e liberação de hormônios (De Laurentiis *et al.*, 2010). Adicionalmente, há evidências de que alguns receptores CB₁ são expressos por células não neuronais, como células imunes, nas glândulas pituitária e adrenal, medula óssea, pulmões, coração, fígado, timo, e em tecidos de órgãos reprodutivos como a próstata e os testículos (Noe *et al.*, 2000; Howlett, 2002; Pertwee, 2005).

Quanto aos receptores CB₂, estes são mais discutidos em relação à inflamação e a sua localização predominantemente em células do sistema imune. Estes receptores, quando ativados, regulam a migração de células imunes e a liberação de citocinas. Estão presentes em ordem decrescente de níveis de expressão em células *natural killer*, monócitos, leucócitos polimorfonucleares, linfócitos CD4⁺ e CD8⁺ (Galgglje *et al.*, 1995). Há também evidências de que os receptores CB₂ são expressos em alguns neurônios, tanto no cérebro como em outros lugares (Skaper *et al.*, 1996; Ross *et al.*, 2001; Van Sickle *et al.*, 2005; Wotherspoon *et al.*, 2005; Baek *et al.*, 2008). No entanto, o papel dos receptores neuronais CB₂ ainda precisa ser melhor compreendido.

Recentemente, foi demonstrado por Malek e colaboradores que o sistema eCB desempenha um papel crucial no manejo da neuroinflamação e que esse efeito é primariamente controlado pelo receptor CB₂. Neste estudo foi avaliada a ativação da micróglia baseada na produção de NO e foi verificado que o pré tratamento com AEA atenuou o aumento da liberação de NO induzida pela administração de LPS. Essa ativação da micróglia demonstrada pelo aumento da produção de NO se correlaciona com doenças neurodegenerativas e, nesse sentido, os autores sugeriram que o sistema eCB, pode ser útil como ferramenta para o tratamento destas condições (Malek *et al.*, 2015). Em contrapartida, Csóka e colaboradores sugeriram que a ativação dos receptores CB₂ por eCB contribui para a disfunção imune e mortalidade durante a sepse (Csóka *et al.*, 2009). Neste estudo, os autores demonstraram utilizando animais *knockout* para

receptor CB₂, que estes apresentam menor mortalidade induzida pela sepse em relação ao animais selvagens, e que além disso, a inativação do receptor CB₂ diminuiu a lesão renal e muscular, suprimiu a ativação do fator de transcrição nuclear kB (NF-kB) e diminuiu a produção de IL-10, IL-6 e da proteína inflamatória derivada de macrófagos-2 (MIP-2) (Csóka *et al.*, 2009).

Como mencionado anteriormente, os eCB podem ser liberados por neurônios pós-sinápticos e agir no receptor CB₁ de neurônios pré-sinápticos. Esta atividade é importante no presente trabalho e, portanto, exploraremos um pouco mais este papel. O resultado dessa ligação é uma redução da liberação de outros neurotransmissores, como o GABA e o glutamato (Freund *et al.*, 2003; Hashimotodani *et al.*, 2007). Quando os canabinóides endógenos se ligam aos receptores CB₁ desencadeiam uma série de mecanismos intracelulares característicos dos receptores acoplados à proteína Gi/o. A maioria dos autores descreve três eventos importantes: (a) inibição da adenilato ciclase, levando a uma diminuição dos níveis de AMPc intracelular e de proteínas quinases A; (b) estimulação de sinalização de proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAP quinase); (c) inibição de canais de Ca²⁺ dependentes de voltagem do tipo N e P/Q, e estimulação de canais de K⁺ tipo A resultando em uma diminuição do influxo de cálcio e num aumento do efluxo de potássio. Portanto, considerando a localização pré-sináptica do receptor CB₁ como mencionado anteriormente, acredita-se que uma vez sintetizados, os eCB sejam liberados pela membrana pós-sináptica, difundindo-se para a membrana pré-sináptica e agindo nos receptores canabinóides, o que muito provavelmente contribui para uma inibição da liberação de neurotransmissores em geral (Di Marzo & Deutsch, 1998; Lutz, 2002; De Petrocellis *et al.*, 2004), por interferirem em uma etapa dependente de cálcio no processo de liberação de vesículas sinápticas (Hoffman & Lupica, 2000).

Os eCB são sintetizados e liberados rapidamente pelos neurônios em decorrência da atividade elétrica induzida por despolarização e consequente influxo de íons cálcio, diferente dos neurotransmissores clássicos, que são estocados e liberados por vesículas (Di Marzo *et al.*, 1998). A inativação dos eCB ocorre principalmente por recaptação e posteriormente são hidrolisados por enzimas específicas. A AEA é metabolizada pela amida hidroxilase dos ácidos graxos (FAAH) em etolamida e ácido araquidônico e o 2-AG por uma lipase de

monoacilglicerol e também pela FAAH (Goparaju *et al.*, 1999) em ácido araquidônico e glicerol (Di Marzo *et al.*, 1998).

Os eCB são produzidos em resposta a estímulos inflamatórios e estresse oxidativo (Di Marzo *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 2001) e estão presentes em elevadas concentrações séricas em pacientes e animais com sepse, e choque séptico (Wagner *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2001). Em 1998 descobriu-se que os eCB também contribuem para o desenvolvimento de hipotensão nos estágios primários do choque. A AEA e o 2-AG são gerados por plaquetas e macrófagos durante o choque séptico e causam hipotensão através da ativação de uma ação direta em receptores canabinóides CB₁, que estão localizados no endotélio ou na musculatura lisa vascular (Wagner *et al.*, 1998).

Wagner e colaboradores apontaram a AEA como possível fator causador da hipotensão observada por choque endotoxêmico, pois a AEA apresenta efeitos vasodilatadores via receptores CB₁ (Wagner *et al.*, 1997). Nesse sentido, o autor sugeriu que há um efeito direto da AEA em contribuir para a hipotensão presente no choque séptico.

Além disso, de acordo com Kadoi *et al.* (2006), demonstrou-se que a administração periférica de AM281, um antagonista CB₁ melhorou a oxigenação arterial e reduziu tanto a superprodução de lactato (um indicador clínico importante da disfunção orgânica) quanto a elevação da temperatura corporal em ratos com sepse induzida pela administração de endotoxina. Ao final, esses fatores levaram a um aumento da taxa de sobrevivência dos animais (Kadoi & Goto, 2006).

Com relação aos efeitos dos canabinóides na temperatura corporal, a AEA quando administrada em doses baixas, causou um aumento da temperatura corporal e, em doses altas, uma redução da temperatura em ratos e camundongos (Crawley *et al.*, 1993). Corroborando com esse achado, Benamar e colaboradores, e Fraga e colaboradores demonstraram que os eCB parecem contribuir para a febre induzida pelo LPS, uma vez que os antagonistas do receptor CB₁/agonistas inversos, rimonabanto (Benamar *et al.*, 2006) e AM251 (Fraga *et al.*, 2009) reduziram a febre induzida por este estímulo.

Deste modo, a ativação do sistema canabinóide está envolvida em muitas condições fisiológicas e patológicas, dentre elas, na resposta febril que pode ser observada na sepse. No entanto, as evidências apresentadas acima

demonstram que embora a participação de eCB na sepse esteja documentada, poucas são as evidências de quais sistemas realmente são afetados por antagonistas e como estas drogas atuariam. Além disso, não foram encontrados dados clínicos do uso de antagonistas/agonistas endocanabinóides em condições como a sepse.

Estudos anteriores de nosso grupo identificaram a participação de endocanabinóides como mensageiros retrógrados na sinalização em células magnocelulares vasopressinérgicas (Zamprônio et al., 2010). Deste modo, passaremos a discutir este sistema e sua relação com a sepse.

1.4 AVP na sepse

O sistema hipotálamo-neuro-hipofisário é uma estrutura cerebral complexa que coordena respostas a perturbações no equilíbrio dos processos fisiológicos. Consiste no núcleo supraóptico (NSO) hipotalâmico, situado lateralmente ao quiasma óptico e nos núcleos paraventriculares (NPV), que se situam no terceiro ventrículo (Figura 1) (Gimpl et al., 2001).

A AVP é sintetizada em neurônios magnocelulares do NSO e NPV, bem como no núcleo acessório situado entre estes núcleos. Esses neurônios magnocelulares situados no hipotálamo projetam-se para a pituitária posterior (Figura 1). Cada neurônio magnocelular tem um axônio que se projeta para a pituitária posterior onde dá origem a 10 000 terminações neurosecretoras que estão repletas de grandes vesículas de núcleo denso contendo os produtos do gene da AVP: a própria AVP, neurofisina II e copeptina (Ludwig & Leng, 2006). Quando ocorre o potencial de ação ocorre a liberação das vesículas para a circulação sanguínea por exocitose dependente de Ca^{2+} (Stoop, 2012).

A via clássica da liberação da AVP neuroendócrina envolve a liberação axonal da AVP da pituitária posterior diretamente para a circulação sanguínea (Figura 1). Nesta, a AVP se liga nos receptores V_{1A} e V_2 para regular o volume sanguíneo e a resistência periférica (Bichet, 2014).

Os principais estímulos para que a AVP seja liberada na corrente sanguínea são a hiperosmolalidade plasmática, a hipotensão arterial e hipovolemia grave (Schrier et al, 1979; Kampmeier et al., 2010).

No entanto, a AVP também pode ser sintetizada em neurônios parvocelulares do NPV que se projetam para a eminência mediana do hipotálamo. Este mecanismo, diferente da secreção axonal na pituitária posterior, parece potencialmente contribuir para um *feedback* do sistema em geral (Pow & Morris, 1989). Esses neurônios parvocelulares secretam AVP de seus dendritos para o hipotálamo, agindo como um sinal autócrino, controlando a atividade dos neurônios magnocelulares (Figura 1). (Stoop, 2012).

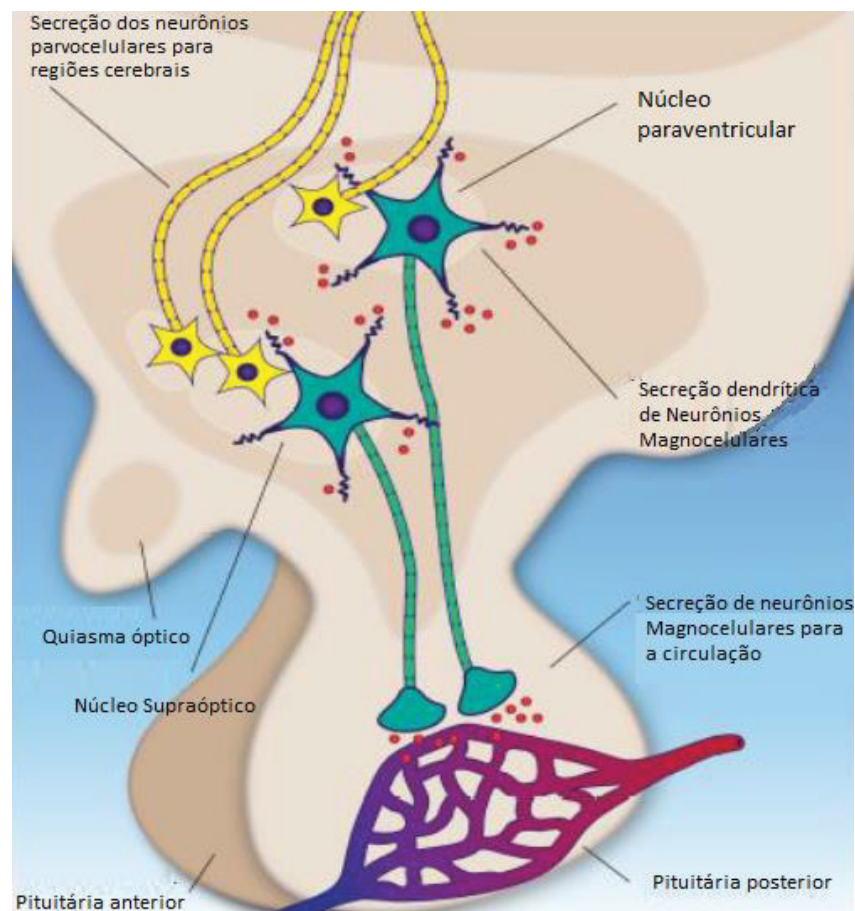


Figura 1: Secreção axônica e dendrítica de AVP: Neurônios parvocelulares (amarelo) secretam AVP (vermelho) para numerosas regiões no cérebro, incluindo amígdala e pituitária anterior. Neurônios magnocelulares (verde) no hipotálamo secretam AVP na circulação periférica via pituitária posterior (via clássica/secção axônica). Além disso, eles secretam esses peptídeos no líquido extracelular do hipotálamo (secreção dendrítica). Adaptado de Beribeau & Anagnostou, 2015.

A AVP também pode ser liberada em terminais pré-sinápticos e em varicosidades axonais não terminais, participando tanto na transmissão sináptica clássica quanto na transmissão por difusão para receptores próximos via fluido extracelular (Neumann & Landgraf, 2012). Assim, a AVP atua em vários tipos de sinalização neuroquímica, principalmente endócrina, mas também parácrina, autócrina e sináptica (Benarroch, 2013).

Com relação ao receptor V_{1A} , este é amplamente distribuído em uma variedade de tecidos periféricos, incluindo músculos lisos vasculares, hepatócitos, cardiomiócitos, plaquetas (Evora *et al.*, 1993). A principal função do receptor V_{1A} é a regulação da PA. Além dos receptores vasculares, o receptor V_{1A} é expresso no córtex adrenal e na medula, nas células renais granulares e no centro barorreflexo, aonde também desempenha um papel crucial na regulação da homeostase cardiovascular (Cowley *et al.*, 1983; Share, 1988).

O receptor V_{1A} presente nos rins medeia o efeito da AVP no fluxo sanguíneo renal envolvido na regulação da homeostase dos fluidos corporais (Inoue *et al.*, 2001). A ativação do receptor V_{1A} diminui o fluxo sanguíneo medular ao induzir vasoconstrição do vaso descendente medular externo (Nakanishi *et al.*, 1995). Também foi sugerido que o receptor V_{1A} atua contra a antidiurese (mediada por receptores V_2) em condições cronicamente desidratadas e regula a produção de renina e a ação da aldosterona (Aoyagi *et al.*, 2008; Memetimin *et al.*, 2009).

Além disso, no SNC, o receptor V_{1A} é encontrado em regiões como o córtex frontal, o hipocampo e a amígdala. Já o receptor V_{1B} , é encontrado apenas no SNC, em regiões como a glândula pituitária anterior, o hipocampo, o córtex, o tálamo e o cerebelo. A ativação do receptor V_{1B} pela AVP na pituitária anterior induz a secreção de ACTH, que por sua vez estimula a liberação de cortisol no córtex adrenal. Em adição, a ativação dos receptores V_{1A} e V_{1B} no SNC, está envolvida com a regulação de emoções e desordens relacionadas ao estresse (Ślusarz, 2015).

Funcionalmente, o receptor V_{1A} , localizado principalmente nos leitos vasculares, ativa a proteína G da família Gq/11. As subunidades α regulam a atividade das isoformas β da fosfolipase C (Barberis *et al.*, 1998). Uma variedade de vias de sinalização estão associadas ao receptor V_{1A} e estas vias incluem ativação do influxo de cálcio, da fosfolipase A_2 , da fosfolipase C e da fosfolipase

D (Briley *et al.*, 1994). Na musculatura lisa vascular, os receptores V_{1A} são encontrados em grande quantidade e causam vasoconstrição por aumentar os níveis intracelulares de cálcio através da ativação de fosfotidil-inositol-bifosfonato (Holmes *et al.*, 2003). Esta vasoconstrição promovida pela ativação dos receptores V_1 nas células do músculo liso vascular é mediada pela hidrólise do fosfatidilinositol bifosfato (PIP_2) para o inositol trifosfato (IP_3) e diacilglicerol (DAG) via ativação da fosfolipase C. Estes segundos-mensageiros aumentam as concentrações de cálcio intracelular através de vários mecanismos, incluindo ativação de canais de cálcio regulados por ligantes e canais de cálcio regulados por voltagem via proteína quinase C, bem como esvaziamento dos estoques de Ca^{2+} intracelular do retículo endoplasmático (Surks, 1999). Em altas concentrações citosólicas, o cálcio forma um complexo com a calmodulina que ativa a quinase, a qual fosforila a cadeia leve de miosina. A miosina fosforilada ativa a miosina ATPase por agir ao longo dos filamentos de actina, que contraem os músculos (Surks, 1999).

Acredita-se que este efeito vasoconstritor da AVP seja responsável pela melhoria na perfusão dos órgãos, melhorando o prognóstico do choque séptico e justificando sua utilização durante esta condição. Os efeitos desejados da AVP e análogos durante a sepse são basicamente relacionados à ativação dos receptores V_{1A} (Leone *et al.*, 2004). No entanto, algumas evidências experimentais sugerem que a ativação de receptores V_{1A} endoteliais também exerce efeitos vasodilatadores em alguns leitos vasculares (ex. artérias pulmonares e coronarianas), provavelmente por mediar aumento da liberação de NO (Sai *et al.*, 1995; Evora *et al.*, 2003). Portanto, como mencionado acima, a AVP liberada pela via clássica tem um papel importante na homeostase de fluidos no organismo e na regulação da PA durante a sepse.

Durante a endotoxemia e a sepse experimental e clínica, a secreção de AVP apresenta um curso bifásico (Siami *et al.*, 2013). Na fase inicial, os níveis plasmáticos de AVP estão elevados em uma tentativa de re-estabelecer a PA reduzida devido à síntese e liberação de citocinas e de NO. Todavia, na fase tardia, quando o paciente ainda apresenta hipotensão arterial (e este estímulo deveria aumentar a liberação de AVP) seus níveis na circulação se encontram basais, o que contribui para o choque séptico (Holmes *et al.*, 2001; Corrêa *et al.*, 2007). Esta evidência também dá suporte a recomendação de que a infusão de

AVP deve ser associada à norepinefrina para suporte hemodinâmico durante a sepse e essa queda dos níveis de AVP pode ocorrer devido uma depleção de seus estoques (Landry & Oliver, 2001; Sharshar *et al.*, 2002; Dellinger, 2013).

A AVP é um hormônio essencial para a homeostasia cardiovascular e osmótica. Melhorar os níveis fisiológicos de AVP pode restaurar o tônus vascular (Holmes *et al.*, 2004).

Adicionalmente, a respeito do papel da AVP no cérebro, há evidências de que esta pode funcionar como um antipirético. Quando a AVP é introduzida no cérebro de uma variedade de espécies, previne ou reduz a febre através de uma ação mediada pelo receptor (Naylor *et al.* 1988). Esta ação ocorre em doses que não têm efeito na temperatura normal do corpo; assim, o peptídeo age como um agente antipirético. Duas áreas que foram identificadas como sensíveis para esta ação antipirética da AVP são a área septal anterior (ASV) e a amígdala medial (Federico, 1992).

A secreção da AVP na circulação sanguínea depende da atividade das células magnocelulares e estas são reguladas pelas sinapses excitatórias glutamatérgicas. Deste modo, a modulação da neurotransmissão glutamatérgica é um mecanismo importante para ajustar a liberação de mediadores neuroendócrinos inclusive da AVP. E esta liberação depende de sinapses glutamatérgicas, que são controladas tanto por eCB quanto pelas ET (Nissen *et al.* 1995; Moos *et al.* 1997; Jourdain *et al.* 1998; Shibuya *et al.* 2000; Hrabovszky & Liposits 2008; Zampronio *et al.* 2010).

1.5 AVP, endocanabinóides, endotelinas e sepse

Luce e colaboradores (2013) sugerem que há uma interação entre o sistema eCB e vasopressinérgico, uma vez que o sistema eCB está presente nos neurônios magnocelulares do sistema hipotalâmico hipofisário e parece inibir a secreção de ocitocina e AVP. Também foi relatada a presença de ET-1 e ET-3 no hipotálamo e a ET-1 foi colocalizada com hormônios neurohipofisários vasopressinérgicos (MacCumber *et al.*, 1989; Yoshizawa *et al.*, 1990; Luce *et al.*, 2013).

Em 2010, Zampronio e colaboradores, através de estudos eletrofisiológicos em fatias de cérebros de ratos, demonstraram que a ET-1,

promoveu uma redução nas correntes pós-sinápticas excitatórias (glutamatérgicas) em células magnocelulares no NSO através da liberação de eCB (Zamprônio et al. 2010). Com o intuito de avaliar onde este sistema seria importante, procurou-se por situações clínicas onde há uma liberação de grandes quantidades de ET-1 bem como alterações nos níveis circulantes de AVP. Dentre estas situações, como já citado anteriormente, encontra-se a sepse (Voerman *et al.*, 1992; Battistini *et al.*, 1996; Iskit *et al.*, 2004). A partir destes estudos levantou-se à hipótese de que durante a sepse a ET-1, por meio da ativação de receptores ET_A presentes no sistema nervoso central, induziria a liberação de eCB, os quais agindo retrogradamente nas terminações pré-sinápticas causariam uma diminuição na neurotransmissão glutamatérgica. Como consequência, haveria um decréscimo na liberação de AVP que, em resposta a isso, ocasiona uma diminuição nos mecanismos vasopressores compensatórios, contribuindo para a hipotensão observada na sepse. Esta hipótese está representada na Figura 2.

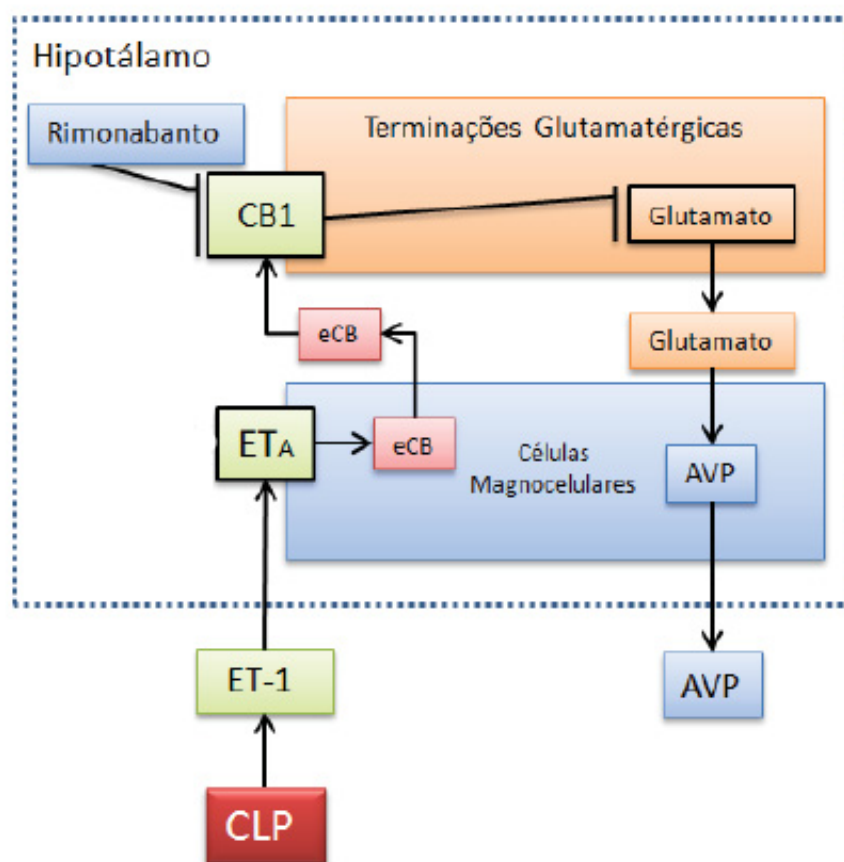


Figura 2: Representação esquemática da sequência de eventos proposta pelos autores. Após a ligação e perfuração do ceco (CLP) ocorre a liberação sistêmica de ET-1, que alcança as células magnocelulares no hipotálamo. A ET-1, atuando em receptores ET_A, promove a liberação de eCB. Estes eCB atuam retrogradamente nas terminações pré-sinápticas em receptores CB₁ que inibem a liberação de glutamato, diminuindo a liberação AVP. O bloqueio dos receptores ET_A por BQ123 e de receptores CB₁ por rimonabanto aumenta os níveis circulantes de AVP.

Trabalhando com essa hipótese, resultados anteriores do nosso grupo demonstraram que o bloqueio do receptor CB₁ pelo rimonabanto, administrado tanto por via sistêmica, quanto pela via i.c.v. e do receptor ET_A pelo BQ 123, administrado via i.c.v. aumentou a taxa de sobrevivência de ratos submetidos à sepse por CLP (Leite, 2014). É importante salientar que ambos os antagonistas foram administrados no momento em que os níveis centrais de ET-1 supostamente estariam aumentados durante a sepse (Sharma *et al.*, 1997), ou seja, 4 e 8 h após o início da sepse. Além disso, demonstramos neste estudo que o tratamento com o antagonista CB₁ rimonabanto e com o antagonista ET_A BQ123 aumentaram os níveis circulantes de AVP 12 h após a indução de sepse por CLP. Estes dados sugeriram um importante papel dos receptores CB₁ e ET_A no desenvolvimento da sepse aumentando a taxa de sobrevivência por causar um efeito indireto em aumentar os níveis plasmáticos de AVP, hormônio essencial para manter a PA regularizada durante o choque séptico.

2. JUSTIFICATIVA

O principal objetivo do tratamento precoce durante o choque séptico, uma consequência da sepse, é aumentar a pressão arterial para melhorar a perfusão tecidual de órgãos vitais. Uma abordagem terapêutica para o tratamento da sepse e da hipotensão hiperdinâmica é a administração de catecolaminas para tentar manter a pressão arterial e o débito cardíaco em níveis normais (Ghosh *et al.*, 1993). Dentre as catecolaminas, a norepinefrina, é um agente vasopressor de primeira escolha, porém foi demonstrado que pode levar a uma forte vasoconstrição na área esplâncnica, o que pode induzir isquemia no trato gastrointestinal (Dellinger *et al.*, 2013).

A vasopressina também tem sido testada como adjuvante no tratamento de choque séptico, uma vez que sua ação vasoconstritora parece melhorar a falência cardiovascular (Russell, 2007). Esta abordagem se justifica, pois, diversos estudos mostram que há alterações importantes na síntese e liberação de vasopressina durante a sepse (Corrêa *et al.*, 2007).

Apesar dos avanços importantes na compreensão de sua fisiopatologia, a terapia para choque séptico permanece amplamente sintomática e de suporte. Estas estratégias clássicas citadas anteriormente não revelaram melhora significativa no tratamento da sepse. Portanto, novas estratégias terapêuticas são necessárias para essa complicação potencialmente fatal. Além disso, dada a expansão da população idosa com senescência imunológica, espera-se que a mortalidade geral por sepse cresça a um ritmo alarmante durante as próximas duas décadas ressaltando a importância de novas estratégias terapêuticas (Martin *et al.*, 2006).

No trabalho desenvolvido durante o mestrado, foi demonstrado que a administração periférica de rimonabanto e a administração central de BQ 123, durante a sepse induzida por CLP em ratos aumentou a taxa de sobrevivência dos animais e os níveis circulantes de AVP 12 h após a CLP, e que a administração periférica de rimonabanto não alterou parâmetros, como dosagem de citocinas e migração celular, mas alterou a resposta febril. Em decorrência deste importante efeito na sobrevivência mais estudos se fazem necessários para investigar de que modo o bloqueio do receptor CB₁ e ET_A poderia contribuir neste processo. Assim, a justificativa principal deste trabalho é buscar novas

estratégias terapêuticas envolvendo o bloqueio de receptores CB₁ e ET_A. Nossa hipótese é que o bloqueio destes receptores pode alterar a dinâmica da sepse, alterando, por exemplo, a responsividade dos vasos a vasoconstritores.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Na primeira parte do presente estudo pretendemos dar continuidade ao trabalho avaliando o efeito sistêmico da administração via oral de rimonabanto, em outros parâmetros como contagem de bactérias na cavidade peritoneal, parâmetros hematológicos, reatividade vascular na aorta, na dosagem de biomarcadores de falência de órgãos, temperatura da cauda e dosagem de nitrito/nitrato. A segunda parte do trabalho teve como objetivo aprofundar o estudo anterior investigando o efeito do bloqueio central dos receptores CB₁ e ET_A em parâmetros como a taxa de sobrevivência, a temperatura da cauda e dosagem de eCB no hipotálamo.

3.2 Objetivos específicos

Parte I

a. Avaliar o efeito da administração sistêmica do antagonista de receptor CB₁, rimonabanto, na contagem de bactérias no exsudato peritoneal em ratos com sepse;

b. Avaliar o efeito da administração sistêmica do antagonista de receptor CB₁, rimonabanto, em parâmetros hematológicos em ratos com sepse;

c. Avaliar o efeito da administração sistêmica do antagonista de receptor CB₁, rimonabanto, na dosagem de biomarcadores de dano ao órgão em ratos com sepse;

d. Avaliar o efeito da administração sistêmica do antagonista de receptor CB₁, rimonabanto, na reatividade vascular a fenilefrina e a vasopressina em anéis de aorta de ratos com sepse;

e. Avaliar o efeito da administração sistêmica do antagonista de receptor CB₁, rimonabanto, na temperatura da cauda de ratos com sepse

f. Avaliar o efeito da administração sistêmica do antagonista de receptor CB₁, rimonabanto na dosagem de nitrito e nitrato em ratos com sepse;

Parte II

g. Avaliar, o efeito da administração central dos antagonistas CB₁ rimonabanto e AM251 (um antagonista mais específico de receptores CB₁) 4 e 8 h após a indução de sepse sobre a taxa de mortalidade dos animais.

h. Avaliar o efeito da administração central de antagonista de receptor CB₁ AM 251 e antagonista de receptor ET_A BQ 123 na temperatura da cauda de ratos com sepse

i. Avaliar o efeito da sepse induzida por CLP nos níveis de eCB AEA e 2-AG no hipotálamo e o efeito da administração central de BQ 123 sobre os níveis de eCB no hipotálamo.

j. Avaliar o efeito da injeção de AVP na vasoconstrição da artéria caudal 24 h após a indução de sepse e o efeito da administração central de AM251 sobre este parâmetro.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Animais

Foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus*) machos, da linhagem *Wistar*, com aproximadamente 200 g, provenientes do biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (UFPR), mantidos a temperatura de 22 ± 1 ° C, ciclo claro/escuro de 12/12 h, água e ração a vontade. Todos os procedimentos aqui descritos foram realizados de acordo com as Diretrizes Brasileiras para a Experimentação Animal definidas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA) e foram submetidos à avaliação e aprovados pelos Comitês de Ética para o Uso de Animais (CEUA) da UFPR (autorização de número 828).

4.2 Drogas, reagentes e meio de cultura

- Antagonista dos receptores ET_A, BQ123 (Sigma Chemicals & Co, São Paulo, SP, Brasil)
- Antagonista dos receptores CB₁ Rimonabanto (SR141716A) (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, Estados Unidos)
- Antagonista dos receptores CB₁ AM 251 (Sigma Chemicals & Co, São Paulo, SP, Brasil)
- Solução de lidocaína injetável com noradrenalina a 2% (Cristália, Prod. Quím. Farm. Ltda, São Paulo, SP, Brasil)
- Halotano (Cristália, Prod. Quím. Farm. Ltda, São Paulo, SP, Brasil)
- Vasopressina (Sigma Chemical, St. Louis, MO, Estados Unidos)
- Fenilefrina (Sigma Chemical, St. Louis, MO, Estados Unidos)
- Acetilcolina (Sigma-Aldrich Co LCC, St Louis, MO, EUA)
- Carboximetilcelulose (Cristália, Prod. Quím. Farm. Ltda, São Paulo, SP, Brasil)
- Cetamina (Vetnil Veterinary Products, Louveira, SP, Brasil)
- Xilazina (Syntec Laboratory, Cotia, SP, Brasil)
- Pentobarbital (Sigma Aldrich & Co, São Paulo, SP, Brasil)

- Heparina (Cristália, São Paulo, SP, Brasil)
- Cloridrato de oxitetraciclina (Terramicina®) – (Pfizer, São Paulo, SP, Brasil)
- Meio de cultura Mueller-Hinton (Laborclin, Pinhais, PR, Brasil)

Todas as doses e concentrações dos fármacos, foram escolhidas a partir de experimentos prévios realizados por nosso grupo de pesquisa do Laboratório de Farmacologia da Dor, Inflamação e Febre da UFPR.

4.3 Indução da sepse: Modelo de ligadura e perfuração do ceco (CLP – *cecal ligation and puncture*)

Para nosso estudo o método escolhido para indução da sepse foi o modelo animal de sepse induzida pela ligadura e perfuração do ceco (CLP), um dos modelos experimentais mais utilizados e considerado um modelo que reproduz no rato, de forma fidedigna, muitas das alterações fisiopatológicas que acometem o homem durante o choque séptico (Buras *et al*, 2005; Deitch, 2005; Torres-Dueñas *et al.*, 2006; Rittirsch *et al.*, 2009).

A perfuração do ceco resulta em peritonite bacteriana, seguida da translocação de bactérias entéricas para o compartimento sanguíneo, já que o ceco é uma fonte endógena de contaminação bacteriana. Sintomas típicos da doença observados em roedores incluem taquicardia, letargia, febre ou hipotermia, piloereção, perda de peso e taquipnéia.

A indução de sepse foi feita de acordo com método descrito por Torres-Dueñas e colaboradores (2006) e Rittirsch e colaboradores (2009) com pequenas modificações. Os animais foram anestesiados com uma solução de cetamina (90 mg/kg, i.p.) e xilazina (10 mg/kg, i.p.). Foi realizada uma incisão mediana longitudinal na pele do abdômen do animal e em seguida a mesma incisão foi realizada no peritônio. Em seguida, foi feita a exposição e ligação de 75% do ceco com uma agulha de diâmetro 16 G, para induzir sepse, posteriormente foram feitas 3 perfurações na borda oposta ao mesentério do ceco e logo após, foi comprimido para extravasamento do conteúdo fecal. Após a perfuração do ceco o intestino foi recolocado na cavidade abdominal, e a musculatura e a pele do animal foram suturadas (Torres-Dueñas *et al.*, 2006;

Rittirsch, Huber-Lang, *et al.*, 2009). De acordo com a curva de sobrevivência estabelecida em nosso laboratório em um estudo anterior (Leite-Avalca *et al.*, 2016), cuja sobrevivência foi de 84% com uma perfuração, 26% com 3 perfurações e 0% de taxa de sobrevivência com 9 perfurações, padronizamos utilizar 3 perfurações para todos os experimentos. Após o procedimento cirúrgico, os animais receberam aproximadamente 3 mL de solução salina (s.c.) como líquido de reanimação. Os animais do grupo falso-operado (sham), foram submetidos à falsa cirurgia, isto é, sem ligadura nem perfuração do ceco. O procedimento cirúrgico inclui a incisão mediana longitudinal na pele e no peritônio, manipulação do ceco e fechamento da cavidade abdominal. Estes animais foram os controles deste modelo.

A indução da sepse por CLP ou falsa cirurgia foi realizada entre as 9 e 11 h da manhã.

4.4 Protocolos experimentais I

Na primeira parte do estudo avaliamos o efeito da administração sistêmica do antagonista de receptor CB₁ na contagem de bactérias, dosagem de marcadores de falência de órgãos, parâmetros hematológicos, níveis de NOx, temperatura e reatividade vascular. Para tanto, os animais foram submetidos a CLP conforme descrito acima e 4 h após a indução da sepse ou após a falsa-cirurgia os animais foram tratados com rimonabanto (10 mg/kg, v.o.) ou com veículo (CMC 10%, p/v). Os diferentes parâmetros foram avaliados 6 e/ou 24 h após a indução da sepse, conforme descrito abaixo, com exceção da contagem de bactérias no peritônio que foi avaliada 8 h após a indução da sepse.

4.4.1 Determinação da contagem de bactérias no exsudato peritoneal

Para a quantificação da presença de bactérias no exsudato peritoneal, os animais foram anestesiados com halotano 8 h após a cirurgia. Dez mililitros de PBS estéril contendo 5 U/mL de heparina e albumina 3% foram injetados na cavidade peritoneal e uma leve massagem foi realizada. Após uma assepsia cuidadosa, a pele do abdômen foi aberta ao longo da linha média sem lesão do músculo e foram coletados aproximadamente 5 mL de líquido de lavagem.

Alíquotas de diluições seriadas do líquido de lavagem peritoneal (10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5}) foram semeadas em placas de Petri contendo meio de cultura Mueller-Hinton e foi permitido o crescimento bacteriano por 24 h a 37° C. Após esse período, foi contado o número de unidades formadoras de colônias (CFU) e os resultados expressos como log CFUs por mililitro (CFU/mL) de fluido peritoneal (Figueiredo *et al.*, 2012).

4.4.2 Determinação dos parâmetros hematológicos

Sob anestesia com solução de cetamina/xilazina, amostras de sangue foram coletadas por punção cardíaca 6 ou 24 h após a cirurgia, em tubos contendo ácido etilenodiaminotetracético disódico (EDTA) a 5% e em seguida, as amostras foram transferidas para tubos plásticos refrigerados. As amostras de sangue foram imediatamente submetidas à análise utilizando um contador de hematologia modelo Horiba automatizado (ABX, Micros 60, Montpellier, França) e análises de leucócitos, neutrófilos, monócitos, linfócitos, granulócitos, hemoglobina, hematócrito e plaquetas foram obtidas. Os resultados foram expressos como o número de células/mL ou % no caso do hematócrito.

4.4.3 Determinação dos níveis de biomarcadores de falência de órgãos

Sob anestesia com solução de cetamina/xilazina, amostras de sangue foram coletadas por punção cardíaca 6 ou 24 h após a cirurgia, foram utilizadas seringas heparinizadas e em seguida, as amostras foram transferidas para tubos plásticos refrigerados. As amostras de sangue foram então centrifugadas a 1000 g por 10 min a 4°C, e as amostras de plasma foram mantidas a -80°C para posterior análise. Os níveis de lactato, LDH, glicose e CK-MB foram medidos no Laboratório Municipal de Curitiba (Paraná, Brasil). Os métodos utilizados para as análises foram: colorimetria para a dosagem de lactato, cinético-UV (piruvato-lactato) para a dosagem de LDH, enzimático-colorimétrico utilizando glicose oxidase para a dosagem de glicose, e quimiluminescência para a dosagem de CK-MB. O material foi processado por um analisador Sysmex XE-2100TM (São Paulo, Brasil) por citometria de fluxo com laser semiconductor, foco e impedância

hidrodinâmica. As amostras de plasma 24 h também foram usadas para avaliar a atividade de NOx como descrito abaixo.

4.4.4 Determinação dos níveis plasmáticos de Nitrato/Nitrito (NOx)

A determinação dos níveis plasmáticos de NOx foi realizada pelo método colorimétrico de Griess (Bryan & Grisham, 2007). Para tanto, as amostras de plasma de 24 h após CLP coletadas conforme descrito no item anterior foram desproteinizadas com sulfato de zinco diluído água Milli-Q. Para a conversão do nitrato a nitrito, as amostras de plasma foram incubadas, a 37 ° C durante 3 h em presença de nitrato redutase expressa em *E. coli*. Após o período de incubação, as amostras foram centrifugadas para a remoção da bactéria. Em seguida, foi retirado 100 µl do sobrenadante e transferido para outra placa de 96 poços e foi acrescentado 100 µl de reagente de Griess. Após dez minutos foi feita a leitura a 540 nm em um leitor de placas. Curvas padrão de nitrito e nitrato (0 a 150 µM/µl) foram realizadas simultaneamente.

4.4.5 Determinação da temperatura da cauda

Os animais foram habituados a uma temperatura ambiente de 28°C (zona termoneutra para ratos) (Gordon, 1990) no dia anterior ao experimento. No dia seguinte, imagens dos animais foram gravadas por 10 min antes da cirurgia (sham ou CLP) usando uma câmera infravermelha (Flir SC660, Portland, OR, USA). Duas horas após os tratamentos (6 h após CLP ou falsa-cirurgia), as imagens dos animais foram capturadas novamente por 10 min. A temperatura da cauda foi determinada como a média de 3-5 medições da terceira parte superior da cauda dos animais nos últimos 5 min do período de 10 min.

4.4.6 Determinação da reatividade vascular

Para a determinação da reatividade vascular seguimos o modelo de Guarido e colaboradores (Guarido *et al.*, 2014). Os animais foram submetidos a sepse ou a falsa-cirurgia e 6 ou 24 h após foram anestesiados com cetamina/xilazina (90/10 mg/kg, i.p.). A aorta torácica descendente foi retirada,

tendo seu tecido conectivo removido. Em seguida, o vaso foi seccionado em anéis medindo aproximadamente 5 mm de comprimento. Esses anéis foram acondicionados, através de hastes conectadas a transdutores, em cubas de vidro contendo solução nutritiva de Krebs-Henseleit constantemente aerada com carbogênio (95% O₂/5% CO₂), mantidos a uma temperatura de 37 °C e submetidos a tensão basal de 1 g.

Foi adotado um intervalo de 1 h com trocas da solução nutritiva a cada 15 min, para estabilização das preparações. Após este período, a preparação foi contraída com solução de KCl 60 mM. Após um novo intervalo de 30 min para estabilização das preparações, foi induzida contração por fenilefrina 1 µM, seguida de administração de acetilcolina 1 µM, para obtenção de relaxamento, o qual indica a presença de endotélio funcional. Em seguida a verificação da integridade do endotélio, um novo período de estabilização foi aguardado e os anéis de aorta foram submetidos a curvas concentração resposta para fenilefrina (1 nM – 3 µM) e vasopressina (1 nM – 3 µM). Os resultados obtidos foram comparados entre os grupos e expressos como variação da contração ou porcentagem de relaxamento. Os registros foram obtidos por meio de transdutores isométricos, acoplados a um amplificador de sinais (Modelo ML 130, ADI Instruments, Bella Vista, Austrália) conectados a um computador contendo um *software* específico de integração (Chart v7.00, PowerLab, ADI Instruments, Bella Vista, Austrália).

4.5 Protocolos experimentais II

Na segunda parte do estudo avaliamos o efeito da administração central de antagonistas de receptor CB₁ e ET_A na taxa de sobrevivência, na temperatura da cauda, nos níveis de eCB no hipotálamo dos animais e o efeito da administração de antagonista de receptor CB₁ na vasoconstrição da artéria caudal, após a administração i.v. de AVP em ratos com sepse. Para tanto, os animais foram inicialmente submetidos à implantação de cânula no ventrículo lateral (conforme descrito abaixo) e em seguida a CLP. Quatro e oito horas após a cirurgia receberam rimonabanto, 10 µg, i.c.v. 2 µl ou 3,5% DMSO como veículo ou receberam CB₁ AM251 1 µg, i.c.v., 2 µl, 10 µg, i.c.v., 2 µl, ou o antagonista do receptor ET_A, BQ 123 (30 pmol, i.c.v. 2 µl) ou seus respectivos veículo DMSO

50% ou salina após a indução da sepse ou após a falsa-cirurgia. Os antagonistas foram administrados utilizando-se uma agulha de microinjeção (30G curta), conectada a uma seringa de Hamilton (25 µl) por um tubo de polipropileno. As doses e os tempos de administração foram baseados em estudos anteriores (Sharma *et al.*, 1997; Leite-Avalca *et al.*, 2016). Sharma e colaboradores demonstraram que os níveis de ET-1 estão aumentados no plasma de 4 a 8 h após a CLP. Assim, escolhemos administrar os antagonistas nesses horários que baseado nos resultados anteriores do nosso grupo foi selecionado como o melhor período de tratamento (Leite-Avalca *et al.*, 2016).

4.5.1 Cirurgia para implantação de cânula no ventrículo lateral

Nos estudos onde se fez a administração central de antagonistas, os animais foram submetidos à implantação de uma cânula no ventrículo lateral, 1 semana antes da indução da sepse. Para tanto, os animais foram anestesiados com solução de cetamina (90 mg/kg, i.p.) e xilazina (10 mg/kg, i.p.). Após tricotomia e assepsia da pele, os animais foram imobilizados em um aparelho estereotático. Foi administrado pela via subcutânea aproximadamente 0,2 mL de uma solução de lidocaína a 2% com vasoconstritor na parte superior da cabeça, seguida de uma incisão de aproximadamente 1 cm de diâmetro na pele, para exposição da calota craniana. Esse procedimento facilitou a remoção do periósteo, contribuindo para a inibição do estímulo doloroso e diminuindo o sangramento.

Após a localização do bregma (tomado como ponto de referência) os parâmetros estereotáticos utilizados para a perfuração do crânio e implantação da cânula no ventrículo lateral direito foram de: -0,8 mm anteroposterior e -1,5 mm lateralmente, com uma inclinação de -3,3 mm da barra incisal (Paxinos & Watson, 2010). A cânula esterilizada, constituída de um segmento de agulhas hipodérmicas, com 16 mm de comprimento e 0,7 mm de diâmetro, foi fixada ao estereotático e introduzida no tecido cerebral com coordenada ventral a 2.5 mm abaixo da superfície craniana (Paxinos & Watson, 2010). Após a cirurgia, os animais receberam injeção de oxitetraciclina (Terramicina, 400 mg/kg, i.m.), como profilaxia cirúrgica. Foi permitido aos animais que se recuperassem da cirurgia por 7 dias e em seguida foi realizada a CLP. Quando aplicável, após o

experimento, foram injetados no ventrículo lateral de cada animal 2 µl de uma solução de azul de Evans (2,5 % em solução salina) e os cérebros foram removidos e a presença do corante no ventrículo lateral foi verificada macroscopicamente. Animais que não apresentaram a coloração do ventrículo ou que apresentaram deslocamento ou bloqueio da cânula durante a injeção, ou ritmo de ganho de peso corporal anormal após a cirurgia foram excluídos do estudo.

4.5.2 Determinação da taxa de sobrevida

Os animais foram submetidos a cirurgia CLP ou sham. Quatro e oito horas após a cirurgia, foram administrados i.c.v. os antagonistas do receptor CB₁, rimonabanto, 10 µg, i.c.v. 2 µl ou 3,5% DMSO como veículo e AM 251, 1 µg, i.c.v., 2 µl, 10 µg, i.c.v., 2 µl ou 50% DMSO como veículo. A taxa de sobrevida foi avaliada a cada 12 horas por 7 dias.

4.5.3 Determinação da temperatura da cauda

Como descrito anteriormente no protocolo I os animais foram habituados a uma temperatura ambiente de 28°C (zona termoneutra para ratos) (Gordon, 1990) no dia anterior ao experimento e no dia seguinte, imagens dos animais foram gravadas por 10 min antes da cirurgia (sham ou CLP) usando uma câmera infravermelha. Duas horas após a administração i.c.v de antagonista de receptor CB₁, AM 251 ou antagonista do receptor ET_A BQ 123 ou seus respectivos veículos, ou seja, 6 h após CLP ou falsa-cirurgia, as imagens dos animais foram capturadas novamente por 10 min. A temperatura da cauda foi determinada como a média de 3-5 medições da terceira parte superior da cauda dos animais nos últimos 5 min do período de 10 min.

Em um segundo experimento sob as mesmas condições de temperatura ambiente, os animais foram submetidos à cirurgia CLP ou sham. Quatro e oito horas após a cirurgia, foi administrado o antagonista do receptor CB₁, AM 251 ou 50% DMSO como veículo. Vinte e três horas, e cinquenta minutos depois da cirurgia, a temperatura da cauda foi avaliada usando a termocâmera. Dez minutos depois, os animais foram submetidos à anestesia com halotano e foi

administrado AVP (0,3 U/kg, i.v.). A temperatura da cauda foi avaliada novamente imediatamente (30 s) e 3,5 min após a injeção de AVP usando termocâmara.

4.5.4 Determinação dos níveis de endocanabinóides no hipotálamo

Os animais foram submetidos à cirurgia CLP ou sham. Quatro horas após a cirurgia, foi administrado o antagonista do receptor ET_A, BQ123 ou veículo (solução salina) como descrito acima. Para a determinação dos níveis de eCBs no hipotálamo, 6 h após a CLP ou falsa cirurgia, os animais foram anestesiados com pentobarbital 40 mg/kg. O cérebro foi dissecado e amostras de hipotálamo foram coletadas. Os hipotálamos foram congelados imediatamente em gelo seco e armazenados a -80°C até a avaliação dos eCB. Para análise do conteúdo de eCB, AEA e 2-AG, o hipotálamo foi submetido a um processo de extração lipídica, conforme descrito Patel (Patel, 2003). As amostras de tecido foram pesadas e colocadas em tubos de cultura de vidro de borosilicato contendo 2 mL de acetonitrilo com 84 pmol de [²H₈] AEA e 186 pmol de [²H₈] 2-AG como controles internos. O tecido foi homogeneizado com um bastão de vidro e submetido ao ultrassom durante 30 min. As amostras foram mantidas durante a noite a -20°C para que ocorresse a precipitação das proteínas e em seguida foram centrifugadas a 1500 g por 3 minutos para remoção de partículas. Os sobrenadantes foram removidos para um novo tubo de vidro e evaporados até à secura sob N₂. As amostras foram ressuspensas em 300 µl de metanol para recapturar quaisquer lipídios aderidos ao tubo de vidro e novamente secados sob N₂. Os extratos lipídicos finais foram suspensos em 20 µl de metanol e armazenados a -80 °C até a análise. O conteúdo dos dois eCB, AEA e 2-AG nos extratos lipídicos em metanol a partir de tecido cerebral foram determinados utilizando o isótopo de diluição, espectrometria de massa de cromatografia líquida, como descrito em seguida (Patel *et al.*, 2005).

As quantidades de AEA e 2-AG foram determinadas por cromatografia líquida - ionização química à pressão atmosférica – espectrometria de massa (1100LC-MSD, SL model; Agilent Technologies Inc., Wilmington, DE, Estados Unidos da América). As amostras foram separadas numa coluna de fase reversa C18 (Kromasil, 250 x 2 mm, 5-µm diâmetro usando a fase móvel A (água

deionizada, 1 mM de acetato de amónio e 0,005% de ácido acético) e a fase B (metanol, 1 mM de acetato de amónio e 0,005% de ácido acético). As amostras foram eluídas a uma taxa de fluxo de 300 µl/min por um gradiente linear. A percentagem de solvente B aumentou linearmente de 85% do solvente B para 100% do solvente B em 25 min e depois foi mantida a 100% do solvente B durante 10 min. Ao longo dos 10 minutos seguintes, o solvente B diminuiu linearmente de 100 para 85% e foi mantido a 85% durante mais 10 min. A detecção foi feita no modo de íon positivo. O monitoramento seletivo de íons foi usado para detectar [²H₈] AEA (*m/z* 356; tempo de retenção = 13.7 min), AEA (*m/z* 348; tempo de retenção 13.9 min), [²H₈]2-AG e 1(3) - AG (*m/z* 387; tempo de retenção = 14.3 e 15.1 min, respectivamente), e 2-AG e 1(3) - AG (*m/z* 379; tempo de retenção = 14.5 e 15.3 min, respectivamente). O 2-AG é normalmente observado como um duplete porque se isomeriza a 1 (3) -AG durante a extração (Stella & Piomelli, 2001), a área de ambos os picos foi combinada para produzir 2-AG total. O conteúdo dos eCB foram normalizados para o peso do tecido úmido.

4.6 Análise estatística

A taxa de sobrevivência foi expressa como percentagem, e o Teste de Log-rank (Mantel-Cox) foi utilizado para determinar as diferenças na curva de sobrevivência. Os demais resultados foram expressos como a média ± erro padrão da média. Para os demais dados foi utilizada a análise de variância (ANOVA) de uma via ou duas vias seguida pelo teste de Bonferroni, quando aplicáveis. Foi considerado estatisticamente significativo um *valor* de *p* menor que 0,05; 0,01 ou 0,001.

5. RESULTADOS

5.1 Parte 1

5.1.1 Efeito da administração periférica de antagonista de receptor CB₁, rimonabanto sobre a contagem de bactérias em animais com sepse

Para avaliar os efeitos sistêmicos do tratamento com rimonabanto que poderiam contribuir para a redução da taxa de mortalidade após CLP, nós avaliamos a contagem bacteriana para a cavidade peritoneal. A CLP aumentou o número de UFC nas amostras de fluido peritoneal após 8 h em comparação com animais falso operados, e o tratamento com rimonabanto não modificou o número de UFC induzido pela CLP na contagem de bactérias no exsudato peritoneal (Figura 3).

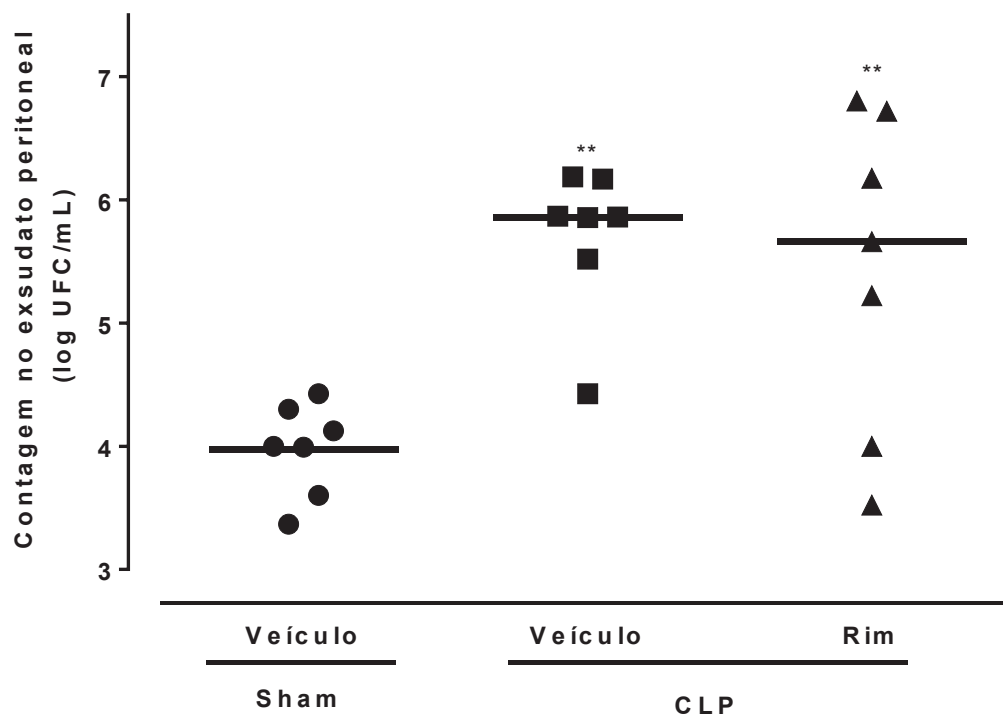


Figura 3: Efeito do tratamento periférico com rimonabanto sobre o número de unidades formadoras de colônia no exsudato peritoneal dos animais submetidos a sepse. Os animais foram submetidos a CLP ou falsa cirurgia e depois de 4 h, receberam rimonabanto (10mg/kg) ou veículo (Veículo: CMC 10%) por via oral. O fluido peritoneal foi coletado 8 h após a cirurgia, e a contagem bacteriana foi avaliada. Os dados representam a média \pm erro padrão da média (e.p.m.) de Log UFC/mL (n=7). ** $p < 0,01$ quando comparados ao grupo sham/veículo.

5.1.2 Efeito da administração periférica de antagonista de receptor CB₁, rimonabanto, sobre a dosagem de lactato e LDH em animais com sepse

A sepse induzida por CLP, 6 h após a cirurgia, induziu um aumento significativo dos níveis plasmáticos de lactato (76%; Figura 4 A), em comparação com o grupo falso-operado. O bloqueio dos receptores CB₁ pelo rimonabanto reduziu significativamente os níveis plasmáticos de lactato (Figura 4 A).

Os níveis plasmáticos de LDH em animais submetidos a CLP tratados com veículo não aumentaram significativamente após 6 h da cirurgia (Figura 4 B).

Vinte e quatro horas após a CLP, os níveis de lactato ainda estavam significativamente elevados (67%; Figura 4 A). Neste momento, os níveis de LDH também se encontraram significativamente elevados (106%; Figura 4 B). O tratamento com rimonabanto 4 h após a indução da CLP reduziu significativamente os níveis de lactato (Figura 4 A) e LDH (Figura 4 B) 24 h após a indução da sepse.

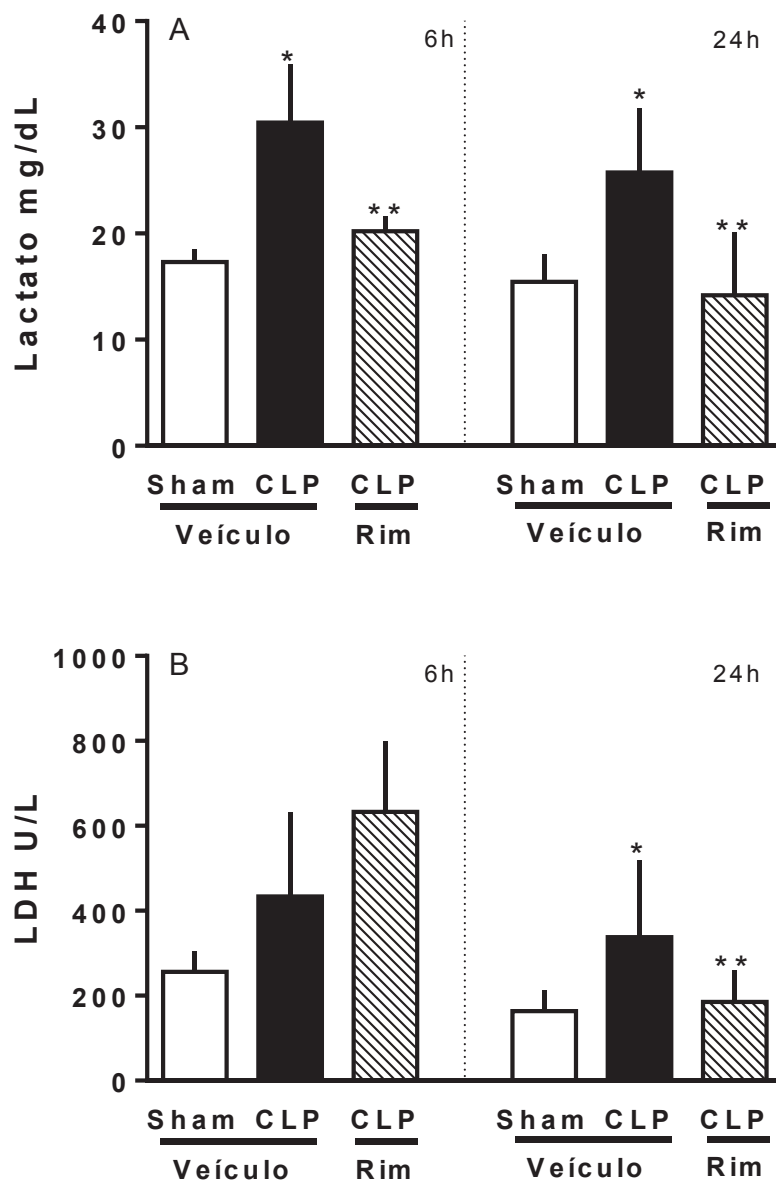


Figura 4: Efeito do bloqueio do receptor CB1 sobre os níveis plasmáticos de lactato e LDH em animais com sepse. Os animais foram submetidos a CLP ou a falsa cirurgia e após 4 h receberam veículo (Veículo, 10% CMC) ou rimonabanto (Rim, 10 mg/kg) por via oral. O sangue foi coletado 6 ou 24 h depois da cirurgia para avaliar os níveis plasmáticos de lactato (A) e LDH (B). Os dados representam a média \pm erro padrão da média (e.p.m.) dos níveis dos biomarcadores em mg/dl ou U/dl (6-13). * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo sham/veículo; ** $p < 0,05$ quando comparado ao grupo CLP/veículo. 5.1.3 Efeito da administração periférica de antagonista de receptor CB₁, rimonabanto, sobre a dosagem de glicose e CK-MB em animais com sepse

5.1.3 Efeito da administração periférica de antagonista de receptor CB₁, rimonabanto, sobre a dosagem de glicose e CK-MB em animais com sepse

A sepse induzida por CLP, 6 h após a cirurgia, induziu um aumento dos níveis plasmáticos de glicose (36%; Figura 5 A) e CK-MB (380%; Figura 5 B) em comparação com o grupo falso-operado. O bloqueio dos receptores CB₁ pelo rimonabanto reduziu significativamente os níveis plasmáticos de glicose (Figura 4 A) e CK-MB (Figura 5 B).

Vinte e quatro horas após a CLP, os níveis de glicose estavam significativamente reduzidos (27%; Figura 5 A), e os níveis de CK-MB retornaram aos níveis normais. O tratamento com rimonabanto 4 h após a indução da CLP normalizou os níveis de glicose (Figura 5 B) 24 h após a indução da sepse.

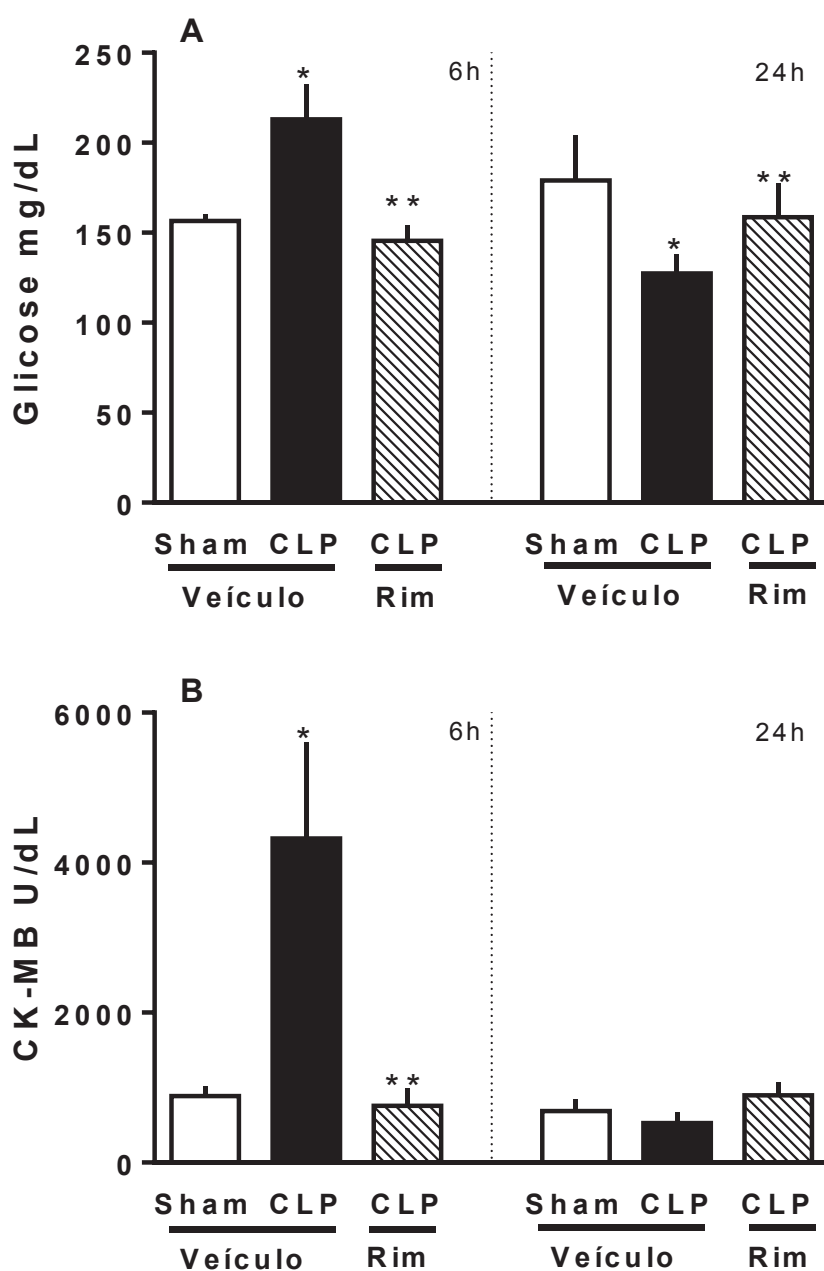


Figura 5: Efeito do bloqueio do receptor CB₁ nos níveis de glicose e CK-MB em animais com sepse. Os animais foram submetidos a CLP ou a falsa cirurgia e após 4 h receberam veículo (Veículo: 10% CMC) ou rimonabanto (Rim, 10mg/kg) por via oral. O sangue foi coletado 6 ou 24 h depois da cirurgia para avaliar os níveis plasmáticos de glicose (A) e CK-MB (B). Os dados representam a média \pm erro padrão da média (e.p.m.) dos níveis dos biomarcadores em mg/dl ou U/dl (6-13). * $p < 0.05$ quando comparado ao grupo sham/veículo; ** $p < 0.05$ quando comparado ao grupo CLP/veículo.

5.1.4 Efeito da administração periférica de antagonista de receptor CB₁, rimonabanto, sobre a contagem de leucócitos em animais com sepse

Seis horas após a CLP, a sepse induziu uma redução na contagem de leucócitos (Figura 6 A) através de reduções do número de linfócitos (Figura 6 B) e monócitos (Figura 6 C), mas não de granulócitos (Figura 6 D) em comparação com o grupo falso-operado. O tratamento via oral com rimonabanto não modificou essas alterações. Não foram encontradas diferenças nas contagens de células 24 h após CLP (Figura 6 A-D).

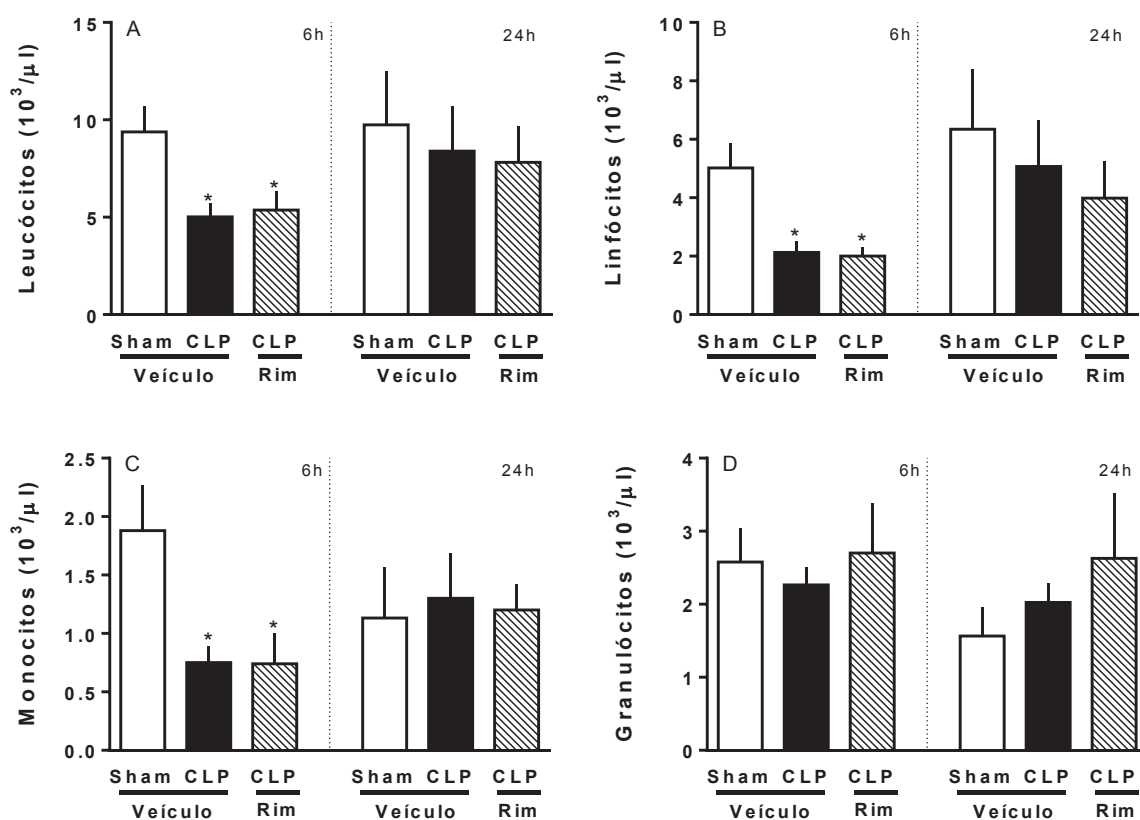


Figura 6: Efeito do bloqueio do receptor CB_1 em parâmetros hematológicos de animais com sepse. Os animais foram submetidos a CLP ou falsa cirurgia e após 4 h da cirurgia eles receberam veículo (Veículo; 10% CMC) ou rimonabanto (Rim, 10mg/kg) por via oral. O sangue foi coletado 6 e 24 h após a cirurgia para avaliar o número de leucócitos totais (A), linfócitos (B), monócitos (C), e granulócitos (D). Os dados representam a média \pm erro padrão da média (e.p.m.) do número de células/ μl ($n=5-7$). * $p < 0.05$ quando comparado com o grupo sham/veículo; ** $p < 0.05$ quando comparado ao grupo CLP/veículo.

5.1.5 Efeito da administração periférica de antagonista de receptor CB₁, rimonabanto, sobre a determinação de parâmetros hematológicos em animais com sepse

Seis horas após a CLP houve uma redução do número de plaquetas (Figura 7 A), mas este número não se mostrou significativamente alterado na vigésima quarta hora. O tratamento via oral com rimonabanto não influenciou na contagem de plaquetas. Não houveram diferenças na contagem de hemoglobina e hematócrito (Figura 7 C-D) 6 h e 24 h após a CLP.

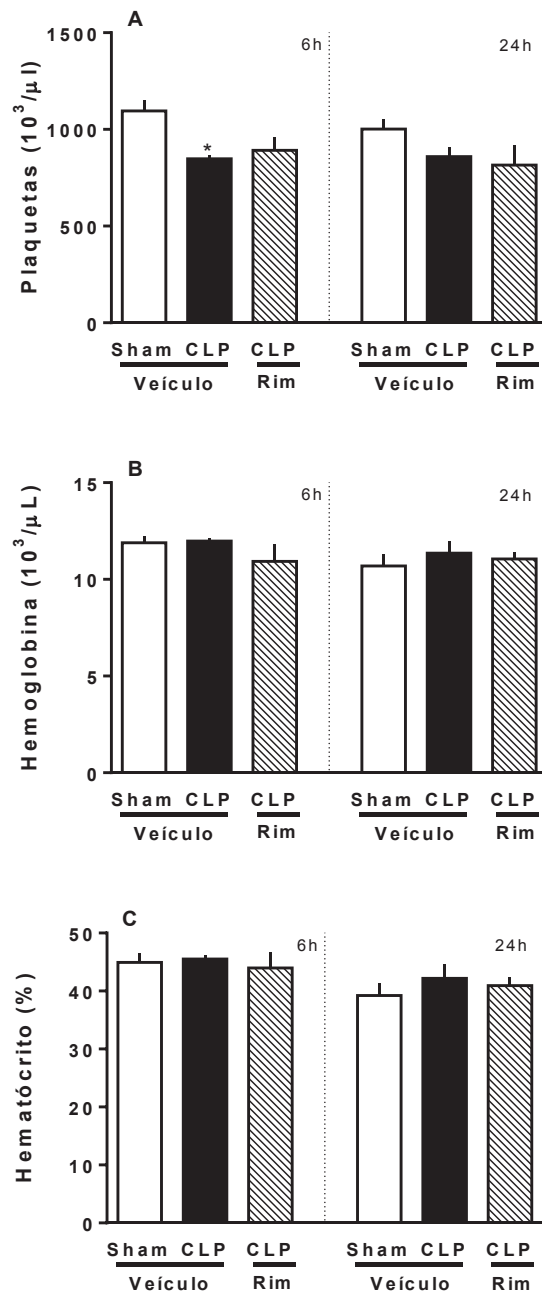


Figura 7: Efeito do bloqueio do receptor CB_1 em parâmetros hematológicos em animais com sepse. Os animais foram submetidos à CLP ou falsa cirurgia e após 4 h da cirurgia eles receberam veículo (Veículo, 10% CMC) ou rimonabanto (Rim, 10mg/kg) por via oral. O sangue foi coletado 6 e 24 h após a cirurgia para avaliar o número de plaquetas (A), hemoglobina (B) e hematócrito (C). Os dados representam a média \pm erro padrão da média (e.p.m.) do número de células/ μL , unidade da hemoglobina ou em %, respectivamente ($n=5-7$). * $p < 0.05$ quando comparado com o grupo sham/veículo.

5.1.6 Efeito da administração periférica de antagonista de receptor CB₁, rimonabanto, na determinação dos níveis de NOx em animais com sepse

Os animais que foram submetidos a CLP ou falsa cirurgia, 4 h após a indução da sepse, receberam o antagonista de receptor CB₁, rimonabanto. Vinte e quatro horas após a CLP, os níveis plasmáticos de NOx estavam significativamente elevados em relação ao grupo sham, e o tratamento via oral com rimonabanto não influenciou essa resposta (Figura 8).

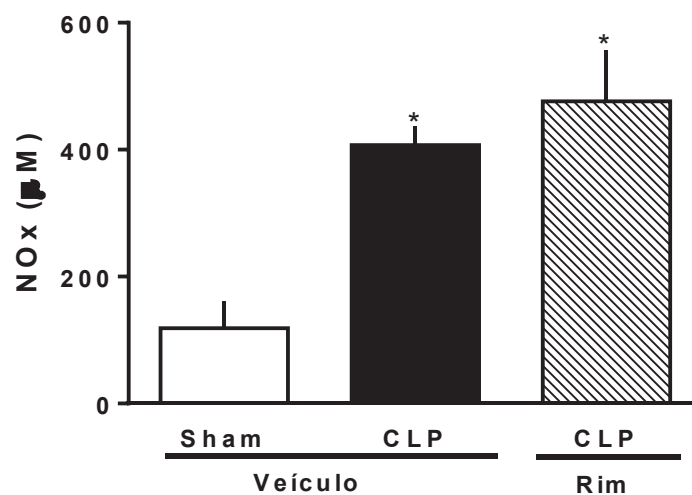


Figura 8: Efeito do bloqueio do receptor CB₁ sobre os níveis plasmáticos de NOx em animais com sepse. Os animais foram submetidos a CLP ou falsa cirurgia e após 4 h, receberam veículo (Veículo, 10% CMC) ou rimonabanto (Rim. 10mg/kg) por via oral. O sangue foi coletado 24 h após a cirurgia para avaliar os níveis de NOx. Os dados representam a média ± erro padrão da média (e.p.m.) dos níveis de NOx em µM (n=5). **p* < 0.05 quando comparado com o grupo sham/veículo.

5.1.7 Efeito da administração periférica de antagonista de receptor CB₁, rimonabanto, sobre a temperatura da cauda em animais com sepse

A temperatura da cauda foi severamente reduzida 6 h após a indução da CLP, demonstrando assim que ocorreu vasoconstrição (uma resposta de conservação de calor que é normalmente observada durante a febre) (Figura 9 A). O tratamento com rimonabanto aboliu completamente esta resposta. Esquemas representativos da termografia nos diferentes grupos são mostrados na figura 8 B-D. A temperatura da cauda do grupo sham (Figura 9 B) e do grupo CLP tratado com rimonabanto (Figura 9 D) é semelhante e superior ao grupo CLP/veículo (Figura 9 C).

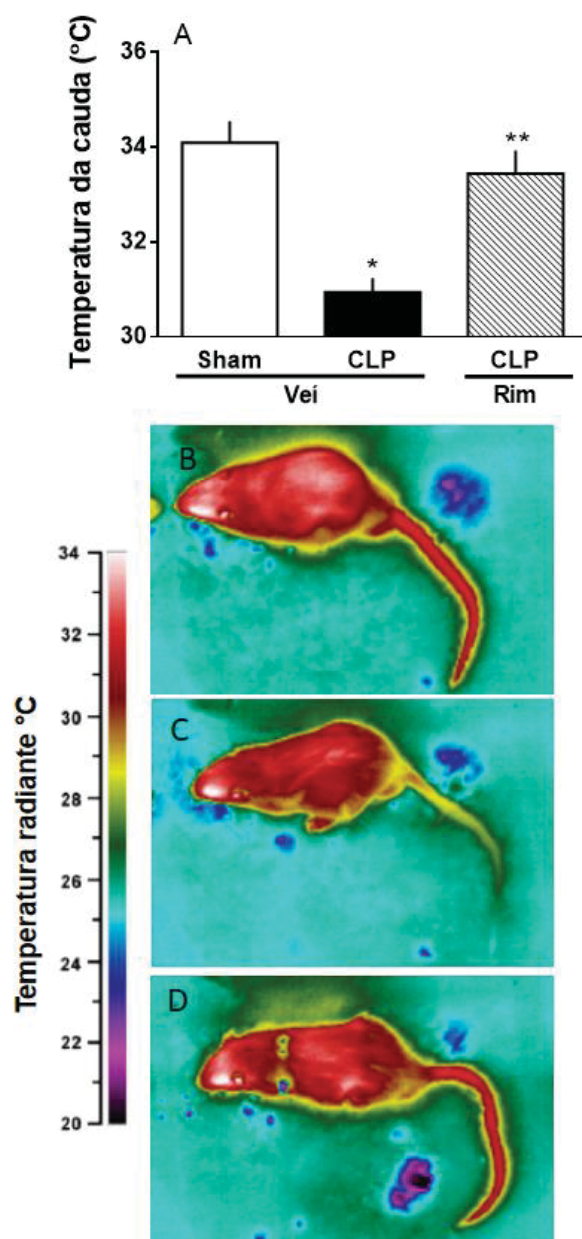


Figura 9: Efeito do bloqueio do receptor CB_1 na temperatura da cauda em animais com sepse. Os animais foram submetidos a CLP ou falsa cirurgia e após 4 h, receberam veículo (Veículo, 10% CMC) ou rimonabanto (Rim, 10 mg/kg) por via oral. A temperatura da cauda foi avaliada 6 h após a CLP usando uma termocâmera. O painel A mostra a temperatura da cauda medida no terço superior da cauda. Os painéis B-D são imagens de infravermelho da cauda de animais representativos dos diferentes grupos: B: Sham/veículo, C: CLP/veículo, D: CLP/Rim. Os dados representam a média \pm erro padrão da média (e.p.m.) da temperatura da cauda em °C ($n=5-6$). * $p < 0.05$ quando comparado com o grupo sham/veículo. ** $p < 0.05$ quando comparado com o grupo CLP/veículo.

5.1.8 Efeito da administração periférica de antagonista de receptor CB₁, rimonabanto, sobre a reatividade vascular ao KCl ou a fenilefrina em animais com sepse

A disfunção orgânica durante a sepse está intimamente relacionada com mudanças na reatividade vascular. O efeito contrátil máximo (Emax) induzido por KCl foi reduzido de $1,43 \pm 0,10$ g para $1,03 \pm 0,09$ g em anéis aórticos de ratos submetidos à CLP 6 h após a cirurgia. (Figura 10 A). Nós avaliamos, em seguida, a responsividade vascular dos vasos de aorta à fenilefrina. Da mesma forma, os anéis de aorta de ratos submetidos à CLP, 6 h após a cirurgia apresentaram menor reatividade à fenilefrina (Figura 10 C). Esse padrão de perda de contratilidade, tanto ao KCl como à fenilefrina, não foi observado 24 h após o CLP (Figura 10 B e 10 D), e o bloqueio do receptor CB₁ não alterou a hiporresponsividade ao KCl ou a fenilefrina (Figura 10 A e 10 C).

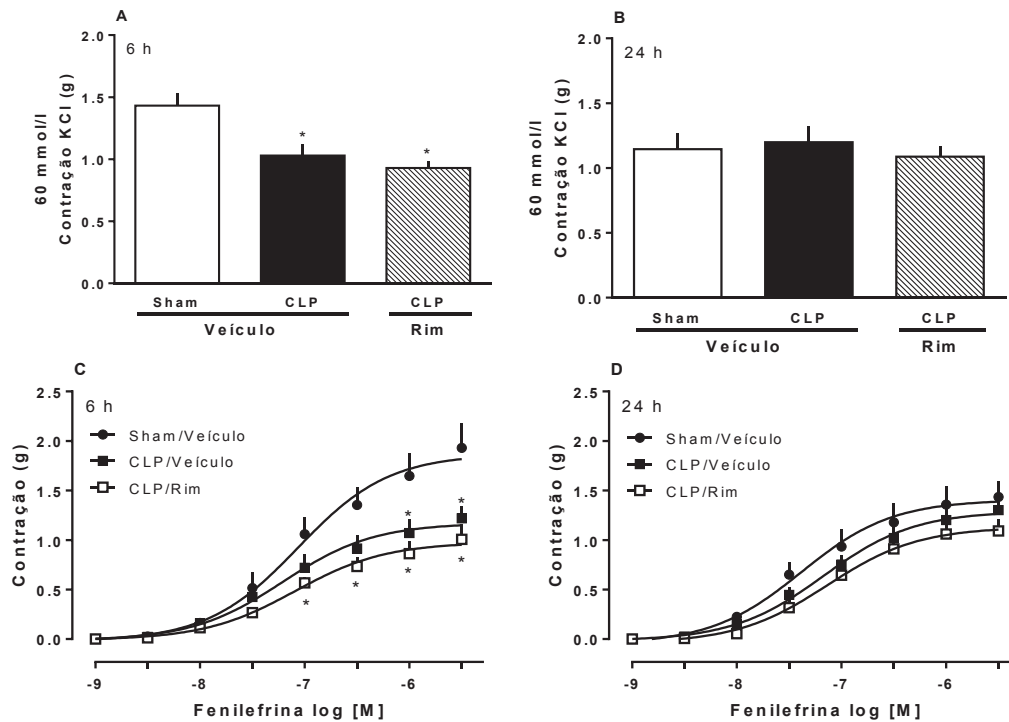


Figura 10: Efeito do bloqueio do receptor CB₁ sobre a reatividade vascular ao KCl e à fenilefrina em anéis de aorta. Os animais foram submetidos a CLP ou a falsa cirurgia e após 4 h receberam veículo (Veículo, 10% CMC) ou rimonabanto (Rim, 10 mg/kg). Os anéis de aorta foram coletados 6 (A, C) e 24 (B, D) h após a cirurgia para avaliar a reatividade vascular à solução de KCl (A,B), e a concentrações cumulativas de fenilefrina (C,D). Os dados representam a média \pm erro padrão da média (e.p.m.) da contração em g (n=6). * $p < 0.05$ quando comparado ao grupo sham veículo. * $p < 0.05$ quando comparado ao grupo CLP/veículo.

5.1.9 Efeito da administração periférica de antagonista de receptor CB₁, rimonabanto, sobre a reatividade vascular à AVP em animais com sepse

Avaliamos a responsividade vascular dos vasos de aorta à vasopressina. Os anéis de aorta submetidos à CLP, 6 h após a cirurgia não apresentaram diminuição na reatividade à vasopressina (Figura 11 A). Surpreendentemente 24 h após a cirurgia os anéis se apresentaram hiper-reativos à vasopressina (Figura 11B) e o tratamento com rimonabanto aboliu essa hiperresponsividade dos anéis de aorta (Figura 11 B).

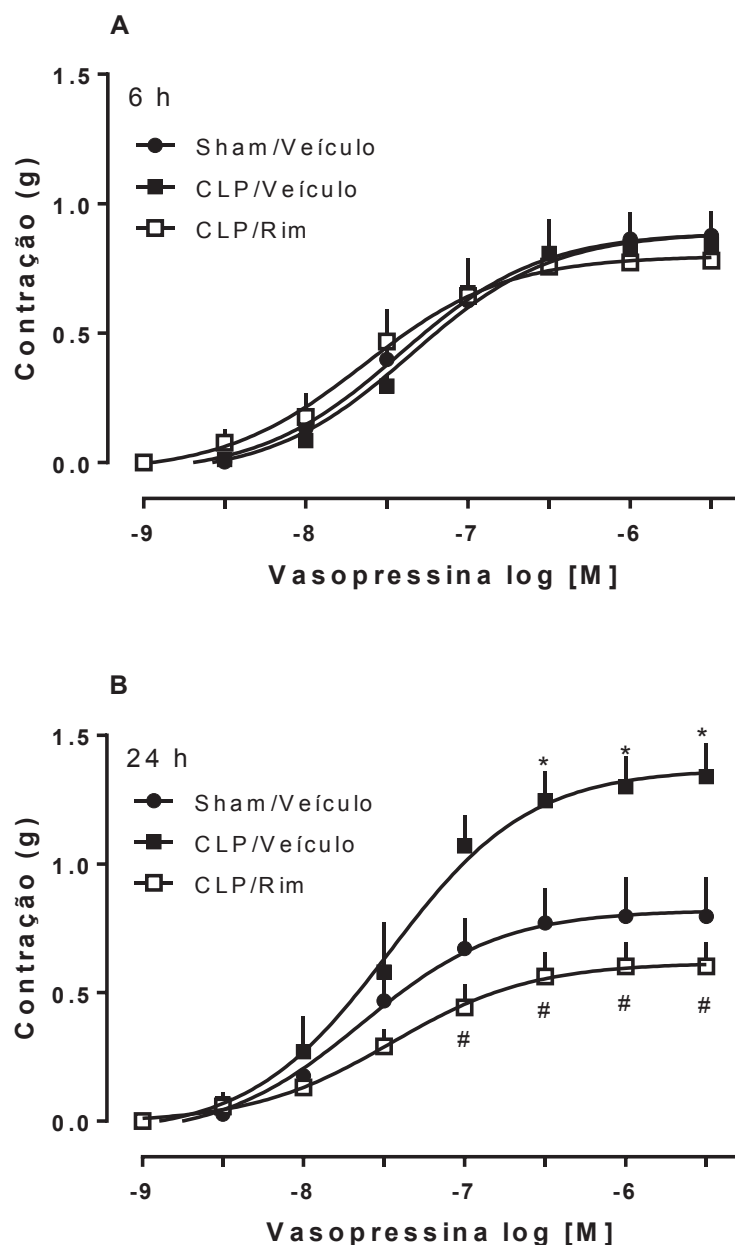


Figura 11: Efeito do bloqueio do receptor CB_1 na reatividade vascular à vasopressina em anéis de aorta. Os animais foram submetidos a CLP ou à falsa cirurgia e após 4 h receberam veículo (Veículo, 10% CMC) ou rimonabanto (Rim, 10 mg/kg) por via oral. Os anéis de aorta foram coletados 6 (A) e 24 (B) h após a cirurgia para avaliar a reatividade vascular a concentrações cumulativas de vasopressina. Os dados representam a média \pm erro padrão da média (e.p.m.) da contração em g (n=6). * $p < 0.05$ quando comparado ao grupo sham/veículo. # $p < 0.05$ quando comparado ao grupo CLP/veículo.

5.2 Parte 2

5.2.1 Efeito da administração central de antagonista de receptor CB₁, rimonabanto, sobre a taxa de sobrevivência em animais com sepse

Na primeira parte do estudo avaliamos o efeito sistêmico da administração via oral de rimonabanto, em parâmetros como contagem de bactérias na cavidade peritoneal, parâmetros hematológicos, reatividade vascular na aorta, na dosagem de biomarcadores de falência de órgãos, temperatura da cauda e dosagem de nitrito/nitrato. Nesta segunda parte do trabalho, investigaremos o efeito do bloqueio central dos receptores CB₁ e ET_A em parâmetros como a taxa de sobrevivência, a temperatura da cauda e dosagem de eCB no hipotálamo afim de fornecer suporte a hipótese do trabalho apresentada anteriormente.

Para tanto, primeiramente avaliamos o efeito da administração de rimonabanto via i.c.v. na taxa de sobrevivência dos animais com sepse induzida por CLP. Os animais sham, como esperado, apresentaram 100% de taxa de sobrevivência. Já os animais que receberam veículo 4 e 8 h após a indução de CLP apresentaram uma taxa de sobrevivência de 31% (Figura 12). O tratamento dos animais com o antagonista de receptor CB₁ rimonabanto, (10 µg, i.c.v. 2 µl) administrado via i.c.v. 4 e 8 h após a CLP aumentou significativamente a taxa de sobrevivência dos animais (Figura 12). O grupo de animais que recebeu o tratamento com rimonabanto apresentou uma taxa de sobrevivência de 69%, resultando em uma diferença de 38% do aumento da taxa de sobrevivência.

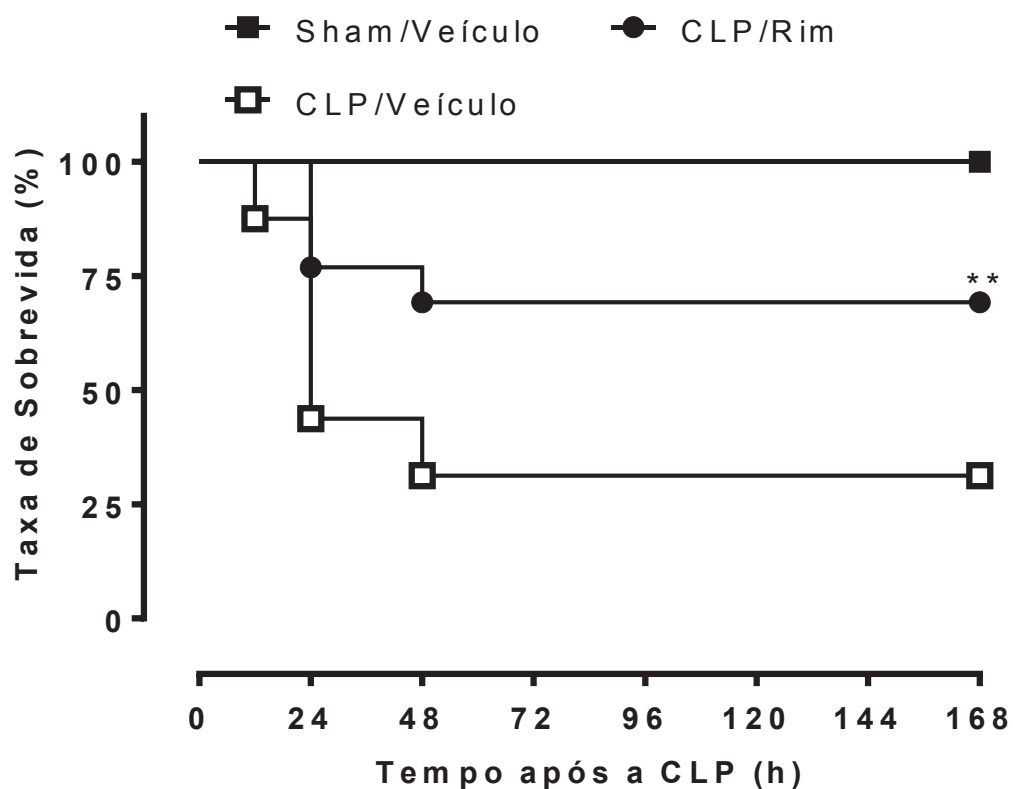


Figura 12: Efeito da administração central de rimonabanto após a CLP sobre a taxa de sobrevivência dos animais. Os animais foram submetidos a CLP (3 furos) ou falsa cirurgia (sham) e após 4 e 8 h receberam a injeção de rimonabanto (Rim 10 µg, i.c.v., 2 µl). Os dados mostram a taxa de sobrevivência (%) avaliada a cada 12 h por 7 dias (n=6-16). ** $p < 0,001$ quando comparados ao grupo CLP/veículo

5.2.2 Efeito da administração central de antagonista de receptor CB₁, AM 251, sobre a taxa de sobrevida em animais com sepse

Os animais sham, como esperado apresentaram 100% de taxa de sobrevida. Já os animais que receberam veículo 4 e 8 h após a indução de CLP apresentaram uma taxa de sobrevida de 31% (Figura 13). O tratamento dos animais com o antagonista de receptores CB₁ AM 251, na dose de 1 µg, i.c.v., 2 µl, administrado via i.c.v. 4 e 8 h após a CLP diminuiu a taxa de sobrevida dos animais em 19%. A administração de AM 251 na dose de 10 µg, i.c.v., 2 µl, aumentou significativamente a taxa de sobrevida dos animais (Figura 13). O grupo de animais que recebeu o tratamento com AM 251 apresentou uma taxa de sobrevida de 100%, resultando em uma diferença de 69% do aumento da taxa de sobrevida.

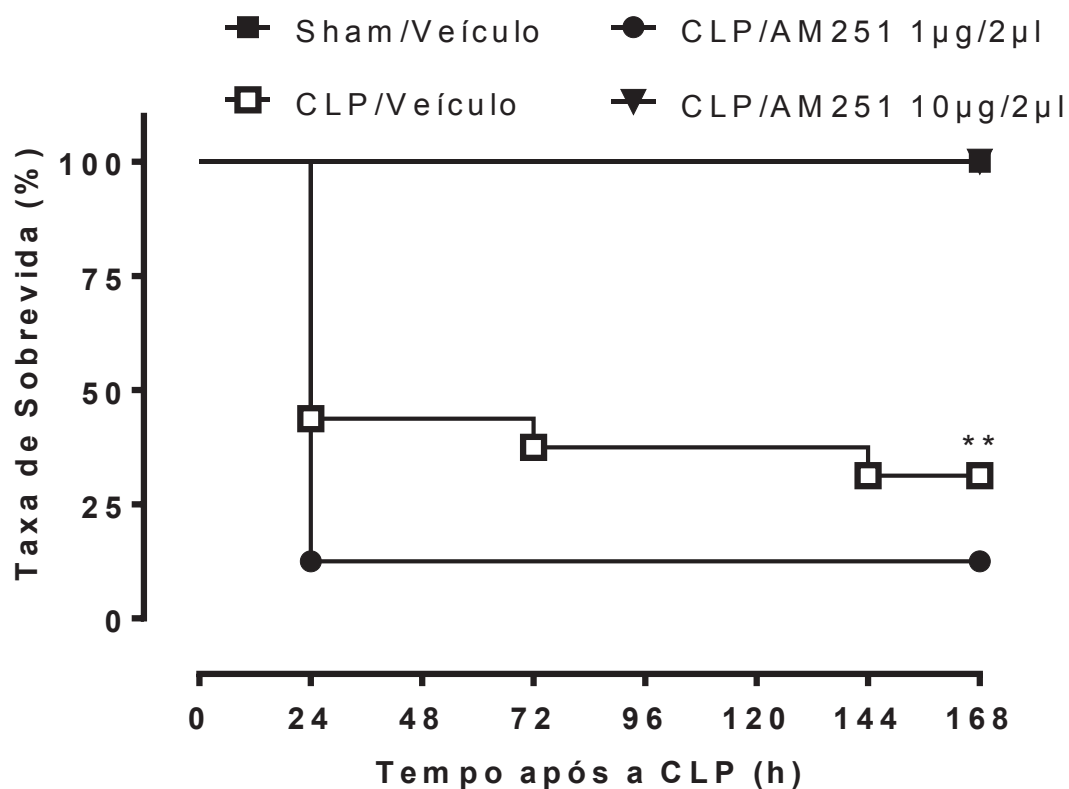


Figura 13: Efeito da administração central de AM 251 após a CLP sobre a taxa de sobrevivência dos animais. Os animais foram submetidos a CLP (3 furos) ou falsa cirurgia (sham) e após 4 e 8 h receberam a injeção i.c.v. de AM 251 (1µg/2µl ou 10µg/2µl). Os dados mostram a taxa de sobrevivência (%) avaliada a cada 12 h por 7 dias (n=6-15). *** $p < 0,001$ quando comparados ao grupo CLP/veículo.

5.2.3 Efeito da administração central de antagonista de receptor CB₁, AM 251, e de antagonista de receptor ET_A, BQ 123 na temperatura da cauda em animais com sepse

A temperatura da cauda foi severamente reduzida 6 h após a indução da CLP, demonstrando assim que ocorreu vasoconstrição (isto é, uma resposta de conservação de calor que é normalmente observada durante a febre) (Figura 14 A). O tratamento com AM 251 (10 µg, i.c.v., 2 µl) ou BQ 123 (30 pmol, i.c.v., 2 µl) aboliu completamente esta resposta. Esquemas representativos da termografia são mostrados na figura 14 B-E. A temperatura da cauda do grupo sham e do grupo tratado (AM 251 ou BQ 123) é semelhante e superior ao grupo CLP/veículo.

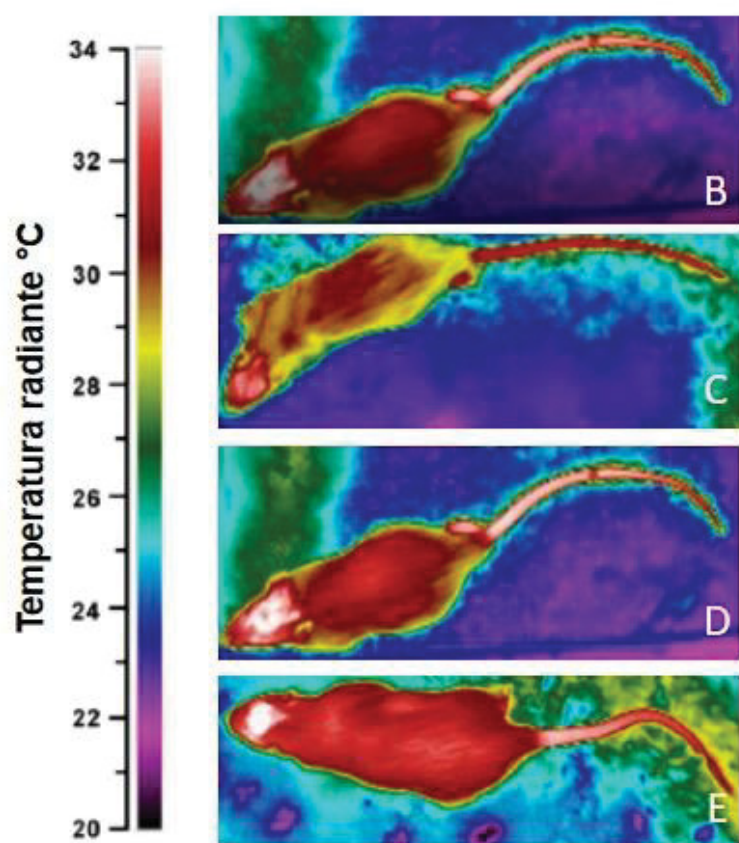
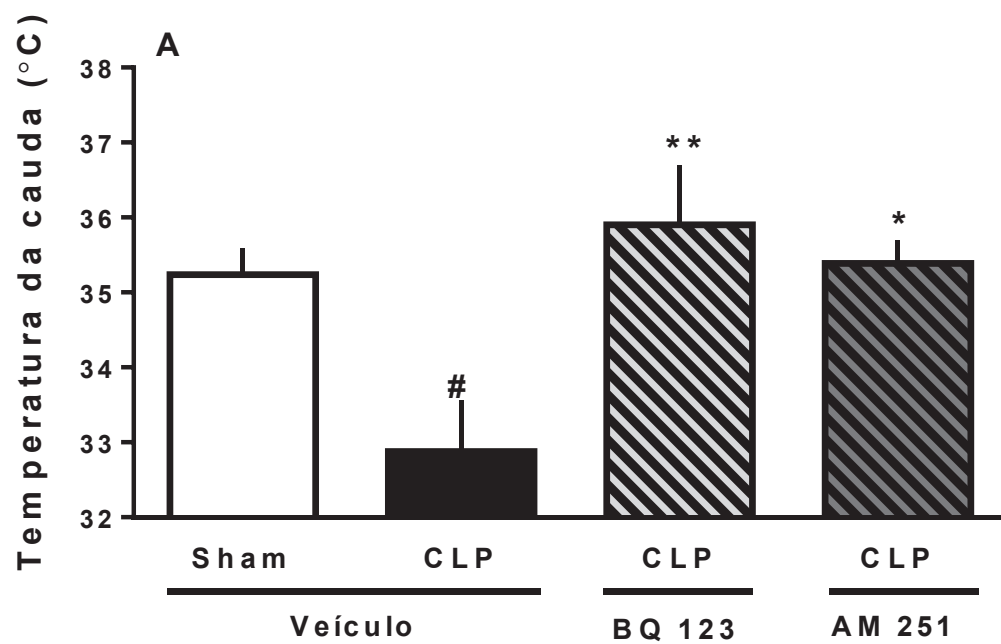


Figura 14: Efeito do bloqueio do receptor CB₁ e do bloqueio do receptor ET_A na temperatura da cauda. Os animais foram submetidos a CLP ou falsa cirurgia. Quatro horas após a cirurgia, receberam o antagonista do receptor CB₁, AM 251 (10 µg, i.c.v., 2 µl) ou antagonista do receptor ET_A BQ 123 (30 pmol, i.c.v., 2 µl) ou veículo (50% DMSO/solução salina ou solução salina, respectivamente). A temperatura da cauda foi avaliada 6 h após CLP usando uma termocâmara. O painel A mostra a temperatura medida no terço superior da cauda. Os painéis B a E mostram imagens representativas de infravermelhos da cauda de animais dos diferentes grupos: B: Sham/veículo, C: CLP/ veículo D: CLP/BQ 123 E: CLP/AM 251. Os dados são expressos como a média ± erro padrão da média (e.p.m.) da temperatura da cauda em °C (n = 6-12). A temperatura ambiente foi mantida a 28°C. * p <0,05 e ** p <0,05, em comparação com o grupo CLP/veículo, # p <0,05 em comparação com sham/veículo.

5.2.4 Efeito da administração central de antagonista de receptor ET_A, BQ 123, na dosagem de endocanabinóides em animais com sepse

Os animais foram submetidos à CLP ou falsa cirurgia, 4 h após a indução da sepse foi administrado o antagonista de receptor ET_A (BQ 123). A sepse induzida por CLP aumentou os níveis de AEA (Figura 15 A) 6 h após a cirurgia em relação ao grupo sham, mas não alterou os níveis de 2-AG (Figura 15 B) no hipotálamo. A administração central de BQ 123 restaurou os níveis de AEA a níveis similares àqueles encontrados nos animais falso-operados (Figura 15 A).

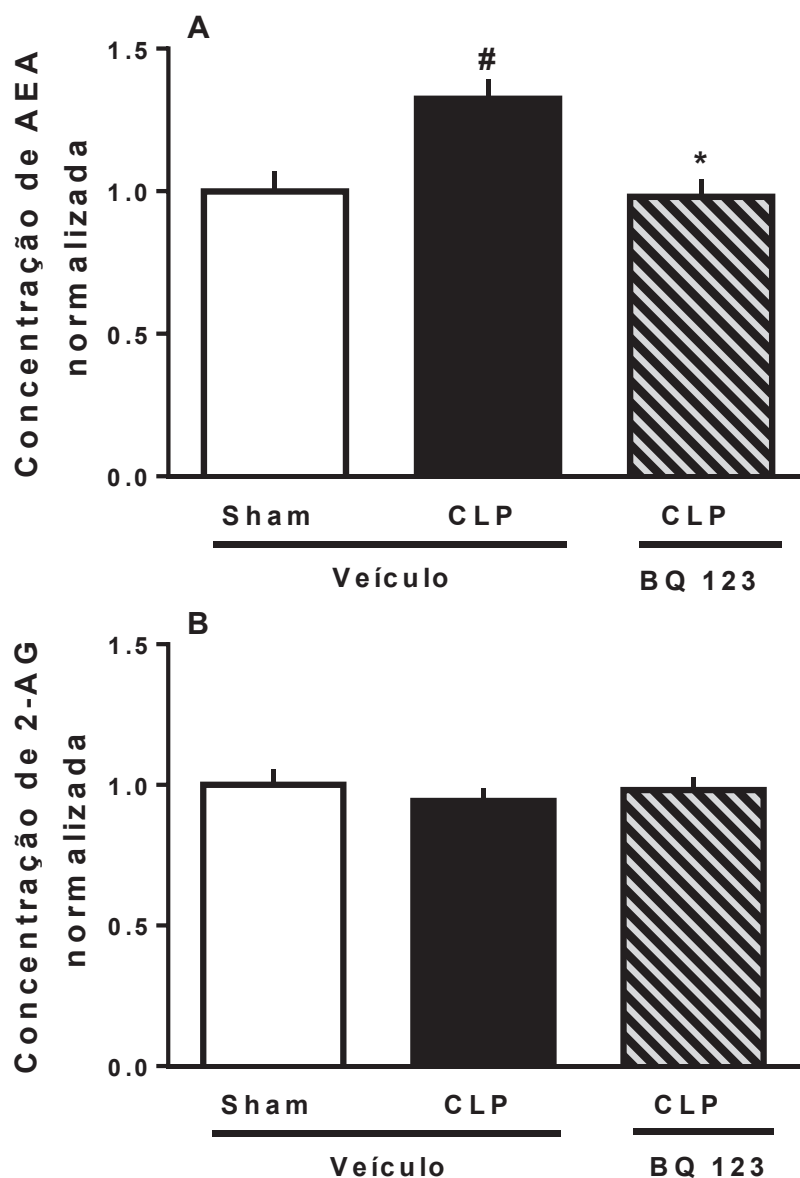


Figura 15. Efeito do bloqueio do receptor ET_A sobre os níveis de AEA e 2-AG no hipotálamo. Os animais foram submetidos a CLP ou a falsa cirurgia. Quatro horas após a cirurgia, receberam o antagonista do receptor ET_A BQ 123 (30 pmol, i.c.v., 2 μ l), ou veículo (salina). Os níveis de AEA e 2-AG foram medidos por cromatografia líquida - espectrometria de massa 6 h após a cirurgia. Os dados são expressos como a média \pm erro padrão da média (e.p.m.) dos dados normalizados (n = 16-19). * p < 0,05 comparado com o grupo CLP/Veículo, # p < 0,05 comparado com sham/veículo.

5.2.5 Efeito da administração central de antagonista de receptor CB_1 , AM 251, na vasoconstrição da artéria caudal após a administração de AVP.

5.2.5 Efeito da administração central de antagonista de receptor CB₁, AM 251, na vasoconstrição da artéria caudal após a administração de AVP

Na primeira parte do estudo verificamos que a sepse induziu aumento da reatividade vascular na aorta 24 horas após a CLP, e que o bloqueio de receptores CB₁ através da administração sistêmica de rimonabanto atenuou essa hiperresponsividade dos vasos aórticos causada na fase tardia da sepse. Para investigar se esse efeito ocorria em outros leitos, e se o bloqueio diretamente no sistema nervoso central de receptores CB₁, assim como aquele obtido pela administração sistêmica de rimonabanto, atenuava a hiperresponsividade dos vasos, procedemos ao próximo experimento. Neste experimento investigamos a responsividade dos vasos à administração exógena de AVP, através da avaliação da temperatura caudal e o efeito da administração central de antagonista de receptor CB₁, AM 251, nessa responsividade dos vasos. Verificamos que a temperatura da cauda foi reduzida 24 h após a indução da CLP, demonstrando assim que ocorreu uma hiperresponsividade na cauda no animal em relação ao animal sham. A administração de AM 251 (10 µg, i.c.v., 2 µl) reverteu esta hiperresponsividade após a administração de AVP 0,03 (U/kg i.v.) i.v. no tempo de 30 segundos (Figura 16 A) e 3 minutos e 30 segundos (Figura 16 B) de AVP 0,03 (U/kg i.v.).

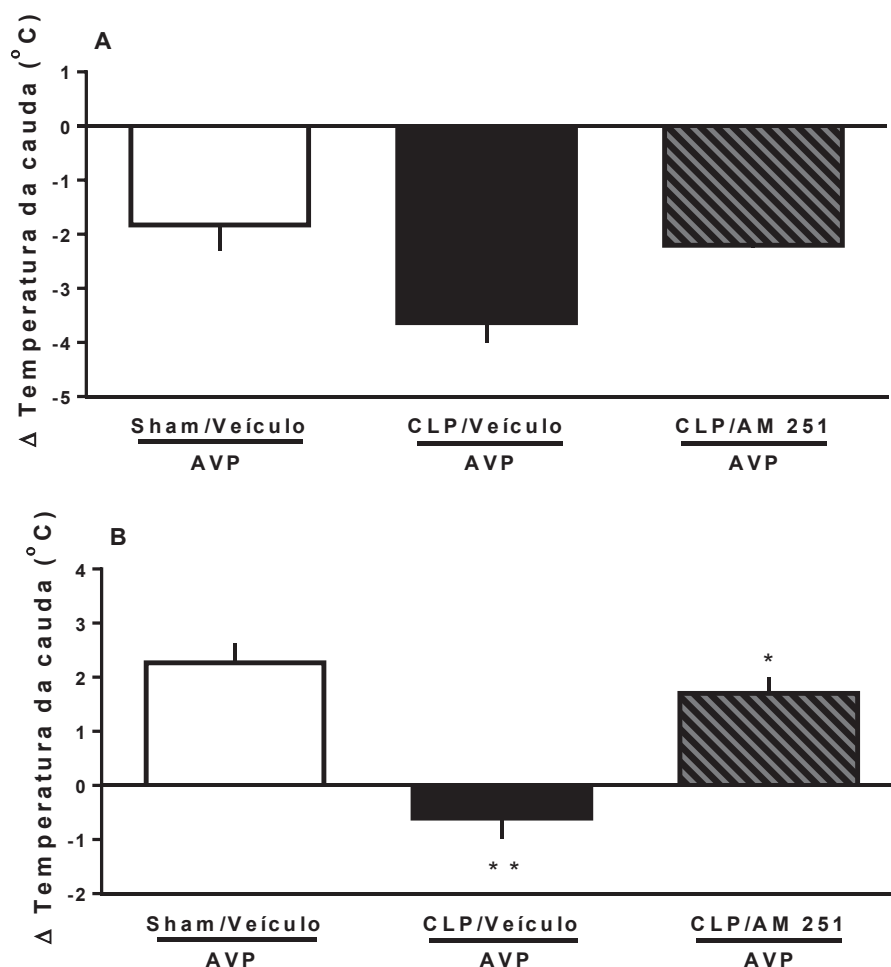


Figura 16. Efeito do bloqueio do receptor CB₁ sobre o efeito da AVP na temperatura da cauda. Os animais foram submetidos a CLP ou falsa cirurgia. Quatro e oito horas após a cirurgia, receberam o antagonista do receptor CB₁, AM 251 (10 µg, i.c.v., 2 µl) ou veículo (50% DMSO/solução salina). Vinte e três horas, e cinquenta minutos depois da cirurgia, a temperatura da cauda foi avaliada usando a termocâmera, dez minutos depois, foi administrado AVP (0,3U/kg, i.v.). A temperatura da cauda foi avaliada novamente imediatamente (30 s, A) e 3,5 min (B) após a injeção de AVP usando termocâmera. Os dados expressam a média ± erro padrão da média (e.p.m.) da variação da temperatura da cauda em °C (n = 4) antes e após a administração de AVP. A temperatura ambiente foi mantida a 28°C. ** p <0,05, em comparação com o grupo sham/veículo, * p <0,05 em comparação com CLP/veículo.

6. DISCUSSÃO

Parte I: Efeitos da administração periférica de rimonabanto sobre a sepse induzida por CLP

A sepse, em sua definição mais recente, é uma disfunção orgânica na qual há risco de vida, causada por uma resposta sistêmica desregulada do hospedeiro a uma infecção (Singer *et al.*, 2016). Esse recente conceito, dá ênfase a alguns pontos importantes. Primeiramente, o conceito estabelece a necessidade de detecção de uma infecção.

Os resultados apresentados neste estudo demonstraram a presença de um número maior de UFC no líquido peritoneal dos animais submetidos à CLP. Estes dados indicam a presença de uma infecção ativa na cavidade peritoneal dos animais qualificando o modelo utilizado. O tratamento dos animais com rimonabanto por via oral, não modificou esta resposta, sugerindo, de maneira geral que o bloqueio de receptores CB₁ não afeta essencialmente o desenvolvimento do processo infeccioso. Deste modo, como demonstramos anteriormente que este tratamento com rimonabanto reduziu a taxa de mortalidade dos animais (Leite-Avalca et al., 2016), podemos sugerir que esta redução na taxa de mortalidade não está relacionada a uma melhora do processo infeccioso.

Adicionalmente, o conceito de sepse estabelece que a resposta observada não é uma resposta homeostática mas trata-se de uma disfunção orgânica. Neste sentido, marcadores de lesão tecidual tornam-se extremamente importantes para o diagnóstico da sepse. A disfunção orgânica pode ser identificada como uma alteração no escore total SOFA, de 2 pontos ou mais, que está associado a uma maior taxa de mortalidade hospitalar. Um escore SOFA igual ou superior a 2 identificou um risco aumentado de 2 a 25 vezes de morte em comparação com pacientes com um escore SOFA inferior a 2 (Singer *et al.*, 2016). Deste modo, qualquer intervenção terapêutica no sentido de aumentar as chances de sobrevida na sepse deve levar em conta a melhora destes marcadores de lesão tecidual.

O lactato normalmente se encontra em níveis plasmáticos elevados em pacientes que apresentam sepse ou choque séptico. Altos níveis de lactato são o primeiro preditor de mortalidade nessa síndrome. Este aumento nos níveis de lactato pode derivar da glicólise e do maior *turnover* de glicose (Brooks *et al.*, 2007). Esse aumento nos níveis plasmáticos de lactato é frequentemente utilizado para avaliar a oxigenação tecidual inadequada em pacientes sépticos e está relacionado à falência múltipla de órgãos (Daniel Lafreniere & Lehmann, 2017). No presente estudo, observou-se aumento nos níveis de lactato 6 e 24 horas após a indução da sepse por CLP, corroborando com observações prévias de Brooks e colaboradores e confirmando a falência de órgãos (Brooks *et al.*, 2007). Outros marcadores plasmáticos de lesão tecidual também devem ser levados em consideração e podem colaborar para a confirmação desta condição. Yang & Ma. (2016) relataram que, além dos níveis de lactato, os níveis de LDH encontram-se elevados em ratos idosos (de 22 a 24 meses de idade) submetidos a CLP, e que esses altos níveis de lactato e LDH na circulação sanguínea foram relacionados à falência múltipla de órgãos. Neste estudo de Yang esse aumento ocorreu 20 h após a CLP (Yang & Ma, 2016). Resultados semelhantes foram observados no presente estudo, mesmo em ratos adultos jovens. No entanto, o tempo de aparecimento destes marcadores no plasma de ratos submetidos a CLP pode variar. Zhou *et al.* observaram o aumento nos níveis de LDH já nas primeiras 6 h após a CLP (Zhou *et al.*, 2015). Essa discrepância no tempo de aparecimento dos marcadores pode estar relacionada à severidade da sepse, uma vez que Zhou e colaboradores ao induzir a sepse por CLP utilizaram uma agulha de calibre 20 para a perfuração do ceco. Essa maior severidade da sepse pode se correlacionar não só a fatores como o tamanho da agulha (e consequentemente o tamanho das perfurações) mas também com o número de perfurações e comprimento de ligação do ceco. Portanto o tamanho da agulha é um dos fatores que pode representar o aumento na severidade da sepse e na taxa de mortalidade e consequentemente uma alteração no tempo de aparecimento dos marcadores de lesão tecidual (Baker *et al.*, 1983; Rittirsch, *et al.*, 2009).

Os resultados do presente estudo revelaram também que os níveis de glicose no sangue aumentaram 6 h após a CLP. Às 24 h, uma redução significativa dos níveis de glicose foi observada. Esta resposta glicêmica bifásica

também já foi relatada anteriormente (Maitra *et al.*, 2000). De acordo com estes autores, a fase inicial da hiperglicemia parece ser mediada por um aumento dos hormônios do estresse, como a noradrenalina e o glucagon, que estimulam a glicogenólise hepática e a gliconeogênese, enquanto a hipoglicemia ocorre mais tarde em decorrência da hipoperfusão de órgãos (Maitra *et al.*, 2000). Neste sentido, a hipoglicemia tardia que ocorre após a indução de sepse também aponta para um quadro de falência múltipla de órgãos.

Zhang *et al.* mostraram que a sepse aumentou os níveis plasmáticos de CK-MB, um indicador de lesões miocárdicas (Zhang *et al.*, 2015). Outro estudo mostrou que os níveis de CK-MB aumentaram 6 h após a CLP e atingiram um pico após 24 h (Zhou *et al.*, 2015). Nossos resultados mostraram que a CLP aumentou significativamente os níveis de CK-MB após 6 h, mas nenhuma mudança significativa foi observada após 24 h. Novamente, isso pode estar relacionado à severidade do choque séptico. De maneira similar ao nosso trabalho, Zhang e colaboradores induziram sepse por CLP com três perfurações no ceco, porém usaram uma agulha maior, calibre 19, enquanto nós usamos de 16. Já Zhou e colaboradores induziram sepse com 2 perfurações no ceco, mas utilizaram uma agulha de calibre 20. Este fator é importante no que se refere a severidade da sepse, como mencionado anteriormente (Baker *et al.*, 1983).

Em conjunto, estes dados sugerem que a sepse induzida por CLP no presente estudo foi consistente com observações anteriores e suficiente para induzir algum grau de falência múltipla de órgãos. No entanto, a duração e a intensidade dessa resposta podem variar dependendo do estudo.

Como mencionado anteriormente, resultados prévios do nosso grupo, utilizando eletrofisiologia em fatias de cérebro de ratos demonstraram que a ET-1 inibiu as correntes pós-sinápticas excitatórias em células vassopressinérgicas magnocelulares através da liberação de eCBs que atuam nos receptores CB₁ pré-sinápticos (Zampronio *et al.*, 2010). Os níveis centrais de ET-1 estão elevados 4-8 h após a sepse ser induzida por CLP (Sharma *et al.*, 1997). Portanto, a hipótese que temos averiguado é que esse aumento nos níveis de ET-1 reduziria consequentemente a liberação de AVP durante a sepse, contribuindo assim para a vasodilatação e hipotensão que, por sua vez, contribuem para a falência de órgãos e consequentemente para as alterações nos marcadores plasmáticos evidenciadas acima. Deste modo, o bloqueio dos

receptores CB₁ no SNC deveria, de acordo com nossa hipótese, aumentar a liberação de AVP e melhorar a falência múltipla de órgãos. De fato, nós constatamos previamente que o tratamento com rimonabanto 4 h após CLP aumentou as taxas de sobrevivência e aumentou a liberação de AVP circulante 12 h após o CLP (Leite, 2014). O presente estudo apoia essa hipótese, pois todos os marcadores plasmáticos de falência múltipla de órgãos melhoraram, se aproximando dos níveis dos animais falso operados tanto 6 como 24 horas após a CLP. Este efeito indica um papel protetor do rimonabanto na falência de múltiplos órgãos e pode deste modo contribuir para a melhora na taxa de sobrevivência dos animais.

A leucopenia, particularmente a linfocitopenia, é uma das manifestações mais frequentes da sepse experimental (Osuchowski *et al.*, 2009) e da sepse clínica (Cohen, 2002) e pode estar relacionada a um aumento na apoptose de linfócitos ou na migração de leucócitos. Ambos receptores CB₁ e CB₂ são encontrados periféricamente, embora a expressão do receptor CB₁ seja maior no SNC (Katchan *et al.*, 2016). Os receptores CB₂ estão envolvidos na imunomodulação e são expressos nas células do sistema imune. Corroborando os resultados apresentados em nossa dissertação de mestrado (Leite, 2014), o presente estudo confirmou que a leucopenia e a redução da contagem de plaquetas permaneceram inalteradas após o tratamento com rimonabanto. O rimonabanto não alterou a leucopenia após a CLP; portanto, a melhora na falência múltipla de órgãos não parece estar relacionada a alterações da resposta inflamatória periférica.

A fim de dar mais suporte a esta observação de que a melhora na falência de múltiplos órgãos promovida pelo rimonabanto não estava relacionada à redução da severidade da resposta inflamatória periférica *per se*, avaliamos os efeitos do rimonabanto nos níveis periféricos de NO e na dinâmica da contração e dilatação dos vasos sanguíneos durante a sepse.

O choque séptico é uma sub-condição da sepse que é acompanhada por anormalidades circulatórias e metabólicas profundas (Singer *et al.*, 2016). Essas anormalidades incluem uma redução da pressão arterial e alterações na temperatura corporal (como, febre ou hipotermia). Essa redução na pressão arterial resulta de uma diminuição da sensibilidade aos agentes vasoconstritores (por exemplo, norepinefrina, angiotensina II e AVP) e um aumento na produção

de agentes vasodilatadores, como o NO. O aumento na produção de NO é alcançado através da indução de enzimas vasoativas pelas citocinas, como a óxido nítrico sintase. A vasodilatação periférica também desempenha um papel fundamental na hipotermia porque ocorre um aumento na perda de calor. Por outro lado, a resposta febril é causada por um efeito das citocinas no sistema nervoso central, particularmente no hipotálamo, que induz a produção de calor (como a termogênese com tremores e sem tremores) e a ativação de mecanismos de conservação de calor (como a vasoconstrição periférica).

No presente estudo, demonstramos que os níveis de NOx, produtos estáveis de oxidação de óxido nítrico (Ho *et al.*, 2010), se encontravam em maior valor em ratos submetidos à sepse em relação aos animais falso operados, corroborando com resultados anteriores (Lorente *et al.*, 1993; Vincent, 1998). O bloqueio dos receptores CB₁ pelo rimonabanto não alterou os níveis de NOx no sangue. Nós também verificamos que a CLP induziu vasoconstrição na cauda, o que é consistente com o desenvolvimento de uma resposta febril nas primeiras horas após a CLP. O tratamento com rimonabanto reverteu essa vasoconstrição na cauda. Esse achado é consistente com resultados anteriores (Leite, 2014), nos quais observamos uma resposta febril em animais 6-8 h após CLP. Além disso, estudos prévios mostraram que a resposta do sistema vascular durante a sepse varia de acordo com o sistema avaliado (por exemplo, artéria caudal vs. artéria mesentérica) e também de acordo com o horário e estímulo avaliado (Bernardelli *et al.*, 2016). Diferente das artérias mesentérica superior e carótida que em geral apresentam uma hiporesponsividade aos vasoconstritores, a artéria caudal mostrou-se hiperresponsiva aos vasoconstritores noradrenalina e AVP 6 e 18 h após a CLP (Bernardelli *et al.*, 2016). Estes resultados sugerem que o tratamento com rimonabanto altera a dinâmica da contratilidade dos vasos sanguíneos e não a produção de vasodilatadores (como, óxido nítrico), o que colaboraria para uma melhora na falência múltipla de órgãos. A hipotensão e o baixo fluxo sanguíneo tecidual causados pela vasodilatação sistêmica são, provavelmente, as causas mais importantes de lesão de órgãos e, portanto, de falência de órgãos. Isso está associado à incapacidade de manter regularmente o tônus em resposta a agentes vasoativos endógenos ou exógenos (O'Brien *et al.*, 2007).

No entanto, o sistema vascular pode, como mencionado anteriormente, se apresentar deficiente na capacidade de manter o tônus, que pode ser diminuído ou aumentado, dependendo do vasoconstritor específico, modelo experimental de sepse e período de avaliação (Bennett *et al.*, 2004; Bernardelli *et al.*, 2016). Mais especificamente, Bernardelli *et al.* relataram uma diminuição na reatividade da artéria carótida em resposta à fenilefrina 6 e 18 h após CLP e em resposta à AVP 18 h após CLP (Bernardelli *et al.*, 2016). No presente estudo, observamos uma redução da vasoconstrição, portanto uma hiporeatividade, induzida pela fenilefrina na aorta 6 h após a CLP, e essa resposta retornou aos níveis normais 24 h após a CLP. Notavelmente, observamos hiperresponsividade a AVP 24 h após a CLP na artéria aorta. Essa resposta aumentada à AVP tem sido observada em outros leitos vasculares, como a artéria caudal (Bernardelli *et al.*, 2016) e nas pequenas artérias mesentéricas (Barrett *et al.*, 2007). De fato, esse fenômeno também foi observado em pacientes sépticos. Os pacientes sépticos apresentaram prejuízos na resposta vasoconstritora à fenilefrina e à angiotensina II no antebraço enquanto que a resposta vasoconstritora à AVP mostrou-se exagerada (Kienbaum *et al.*, 2008). As razões precisas para essas mudanças na sensibilidade do AVP durante a sepse (refratária, sem alterações ou hipersensível dependendo do leito vascular envolvido) são atualmente desconhecidas, mas alguns estudos sugerem que a explicação pode ser estar relacionada à expressão de receptores vasculares (Barrett *et al.*, 2007). Com base nos dados disponíveis, os leitos vasculares parecem desenvolver hipersensibilidade em tempos posteriores (isto é, sepse tardia), mas isso também pode variar de acordo com a gravidade da sepse. Assim, é possível que a alta liberação de AVP nas fases iniciais da sepse seguida de baixas concentrações de AVP na fase mais tardia (Landry & Oliver, 2001; Sharshar *et al.*, 2003) promovam um aumento na expressão de receptores V_{1A} em alguns leitos vasculares na fase tardia o que levaria a um aumento na responsividade de alguns leitos vasculares a este vasoconstritor.

É importante ressaltar que o presente estudo demonstrou que o rimonabanto não influenciou a hiporresponsividade à fenilefrina, mas normalizou a hiperreatividade à AVP nos anéis aórticos de ratos que foram submetidos à CLP. Este resultado sugere que o bloqueio dos receptores CB₁ pelo tratamento com rimonabanto afeta especificamente esta resposta ao AVP e não a fenilefrina.

Mostramos anteriormente que o tratamento de animais sépticos com rimonabanto aumentou os níveis sanguíneos de AVP 12 h após a CLP (Leite-Avalca *et al.*, 2016). Assim, estes dados estão de acordo com a hipótese apresentada, ou seja, os níveis elevados de ET-1 no SNC 4-8 h após o início da sepse poderiam aumentar a liberação de eCB que, por sua vez, atuariam nos neurônios vasopressinérgicos inibindo a liberação subsequente de AVP. A redução dos níveis sanguíneos de AVP na fase mais tardia da sepse estaria relacionada à hiperreatividade de alguns leitos vasculares a este agonista. Deste modo, o bloqueio dos receptores CB₁ pelo rimonabanto no SNC, não permitiria a efetivação desta ação da ET-1, levando a um aumento da liberação de AVP em uma fase mais tardia, e esse efeito contribuiria para regularizar a sensibilidade dos vasos a AVP, assim como a falência múltipla de órgãos.

Assim, os principais achados da primeira parte do presente estudo foram que o tratamento oral com rimonabanto normalizou os níveis de biomarcadores de disfunção de órgãos, como lactato, LDH, glicose e CK-MB bem como a vasoconstrição na cauda, em ratos com sepse que foi induzida por CLP, embora alguns sinais da gravidade da sepse (como leucopenia, trombocitopenia e níveis elevados de NOx) permaneceram inalterados. O tratamento via oral com rimonabanto também atenuou a hipercontratilidade induzida pela vasopressina, mas não afetou a hipocontratilidade induzida pela fenilefrina. Essa melhora nos parâmetros relacionados a falência múltipla de órgãos pode estar relacionada a uma melhor resposta dos vasos à AVP em uma fase mais tardia da sepse.

Parte II Efeito do bloqueio central do receptor CB₁

Os dados apresentados até o momento, juntamente com nossos estudos iniciais onde o rimonabanto foi administrado por via oral (Leite, 2014) demonstraram que o bloqueio do receptor CB₁ em ratos 4 h após a indução de sepse por CLP melhoraram a sobrevivência dos animais possivelmente por promoverem uma redução nos parâmetros que indicam falência de múltiplos órgãos. Kadoi & Goto (2006) demonstraram que a administração periférica ou infusão de AM281, um antagonista/agonista inverso seletivo do receptor canabinóide CB₁ administrado concomitantemente ou logo após a indução de CLP melhorou a oxigenação arterial e reduziu tanto a superprodução de lactato

quanto a temperatura corporal elevada em ratos com endotoxemia induzida por administração de endotoxina. Em conjunto, esses fatores levaram a um aumento na taxa de sobrevivência dos animais (Kadoi & Goto, 2006). De maneira similar, Caraceni e colaboradores demonstraram que o mesmo antagonista utilizado neste estudo, o rimonabanto, foi efetivo em melhorar o dano hepático, a perfusão hepática e a pressão arterial em um modelo de dano por isquemia-reperfusão (Caraceni *et al.*, 2009). Neste estudo, este efeito foi atribuído a uma redução na migração de neutrófilos para o fígado bem como uma redução dos níveis periféricos de LPS. Portanto, o presente estudo, juntamente com estes estudos anteriores, reforça o conceito de que o bloqueio de receptores CB₁ melhora a deterioração hemodinâmica observada em alguns estados inflamatórios, inclusive durante a sepse.

No entanto, em nosso estudo anterior (Leite, 2014) já apresentávamos evidências que este efeito do rimonabanto poderia dever-se, pelo menos em parte, a um efeito central desta droga, pois a administração i.c.v. do antagonista de receptores ET_A, BQ123, promovia um efeito similar ao do rimonabanto na taxa de sobrevivência dos animais, bem como aumentava os níveis circulantes de AVP. Assim, a fim de obter uma evidência direta, procedemos à administração i.c.v. de rimonabanto. De maneira similar ao que foi observado com a administração periférica, a administração central de rimonabanto aumentou a taxa de sobrevida dos animais submetidos à CLP. Para dar mais suporte a esta observação, utilizamos também um antagonista mais seletivo dos receptores CB₁, o AM251. Novamente, a administração central deste antagonista promoveu um aumento na taxa de sobrevida dos animais. Estes dados vão ao encontro com aqueles reportados por Villanueva e colaboradores (2009), que haviam demonstrado que a administração central de rimonabanto imediatamente após e até 3 h após a indução de endotoxemia por LPS preveniu a redução da pressão arterial. Em nosso estudo, a administração central de rimonabanto e de AM 251, como mencionado anteriormente, foi realizada no momento em que os níveis de ET-1 se encontravam elevados em ratos submetidos à CLP (Sharma *et al.*, 1997) portanto 4 e 8 h após a indução de sepse por CLP. Nossos dados sugerem que, pelo menos em parte, o efeito anteriormente observado de melhora da sobrevida dos animais com sepse e dos danos aos órgãos após a administração periférica de rimonabanto deve-se a um efeito no SNC desta droga. Uma importante

diferença entre o presente estudo e os estudos anteriores é que o bloqueio dos receptores CB₁ foi feito entre 4 e 8 h após a indução de sepse, um protocolo que é mais fácil de ser aplicado a situações clínicas.

Tem sido relatado ainda que os níveis circulantes elevados de ET-1 aumentam diversos estados de choque (Lorente *et al.*, 1993). Embora estes níveis elevados de ET-1 possam contribuir para uma elevação da pressão arterial por sua ação vasoconstritora, em excesso podem também levar a uma vasoconstrição excessiva nos leitos vasculares periféricos e assim contribuir para a disfunção múltipla de órgãos (Bernardelli *et al.*, 2016).

Tanto a hipotermia quanto a febre estão entre os quatro elementos da resposta inflamatória sistêmica necessários para o diagnóstico de sepse (Khodorkovsky *et al.*, 2018). A febre, um aumento na temperatura corporal devido a uma elevação da faixa de regulação da temperatura no hipotálamo (Feldeberg & Saxena, 1971), é a manifestação mais comum da síndrome da resposta inflamatória sistêmica e acredita-se que tenha um valor adaptativo para melhorar a capacidade do sistema imunológico em eliminar microrganismos invasores (Kluger, 1991). Entretanto, conforme a síndrome da resposta inflamatória sistêmica se intensifica em gravidade, a mudança de um estado febril para a hipotermia é frequentemente observada (Romanovsky *et al.*, 2005). Não está bem estabelecido se a hipotermia natural é prejudicial na sepse. Há evidências de que quando a hipotermia ocorre naturalmente é mais vantajosa do que a febre em formas graves de inflamação sistêmica (Liu *et al.*, 2012). No entanto, esta questão ainda requer maiores debates.

Já foi evidenciada tanto a participação do sistema encanabinóide assim como do sistema endotelinérgico em muitas condições patológicas, e particularmente na febre (Fabricio *et al.*, 1998; Fraga *et al.*, 2009; Mechoulam *et al.*, 2014).

A AEA promove aumento de maneira dose dependente na temperatura corporal em ratos quando administrada por via i.c.v. (Fraga *et al.*, 2009). O efeito da AEA na temperatura corporal foi mimetizado pela administração central de um agonista seletivo do receptor CB₁, e prevenida pelo tratamento com um antagonista do receptor CB₁, AM 251, enquanto os ligantes seletivos para os receptores CB₂ foram inativos (Fraga *et al.*, 2009). Nos estudos de Fraga e colaboradores a administração central de AM 251 também reduziu a resposta

febril induzida por LPS. Estes dados sugerem que a AEA é um importante mediador da resposta febril induzida por LPS atuando via receptores CB₁ presentes no SNC e possivelmente no hipotálamo.

Demonstramos anteriormente que em nosso modelo de sepse induzida por CLP (3 furos) houve um aumento da temperatura corporal, e a administração sistêmica de rimonabanto atenuou essa resposta (Leite-Avalca et al., 2016). No presente estudo estendemos esta observação demonstrando que a indução de sepse por CLP diminuiu a temperatura da cauda dos animais, sugerindo uma resposta vasoconstritora (ou seja, uma resposta de conservação de calor que é geralmente observada durante a febre). Adicionalmente, no presente trabalho, demonstramos que tanto a administração central de AM 251 quando a de BQ 123, quando injetada 4 h após a cirurgia, atenuou esta resposta de vasoconstrição cutânea.

Com relação ao efeito do AM251, estes dados sugerem que, assim como quando da administração de LPS, a indução de sepse por CLP promove um aumento de AEA no SNC que também é responsável pela resposta febril, evidenciada pela vasoconstrição cutânea.

O efeito do BQ123 na redução da temperatura da cauda, no entanto, ainda não está muito claro. Fabricio e colaboradores demonstraram que a ET-1 também participa da resposta febril induzida por LPS (Fabrício et al., 1998). No entanto, em ratos, a resposta febril induzida por LPS é substancialmente reduzida pelo bloqueio dos receptores ET_B mas não por antagonista do receptor ET_A (Fabricio *et al.*, 2005). Esta é a primeira vez que uma resposta comumente observada durante a febre, como redução na temperatura de resposta da cauda, é afetada pelo bloqueio do receptor ET_A. A razão para esta discrepância precisa de mais estudos e pode estar relacionada a diferenças na quantidade de ET-1 produzida após a injeção de LPS e na sepse e a densidade de receptores ET_A e ET_B no hipotálamo. É importante ressaltar, no entanto, que Zampronio et al. (2010) demonstraram que somente receptores ET_A (e não ET_B) estão envolvidos na liberação de eCB pela ação da ET-1 por células vasopressinérgicas. Portanto, é possível que a administração de BQ123 esteja afetando particularmente a vasoconstrição cutânea, mas não a resposta febril como um todo. Como ressaltado anteriormente, este ponto precisa de mais estudos.

Assim, o passo seguinte em nosso estudo foi avaliar se a sepse induzida por CLP promovia um aumento nos níveis de eCB no hipotálamo e se a administração central do antagonista de receptores ET_A era capaz de reduzir estes níveis. Colocando de outra maneira, a liberação de eCB por ET-1 que Zampronio e colaboradores observaram em fatias de cérebro poderia ocorrer *in vivo* em um animal com sepse. Nossos resultados mostraram que a sepse induzida pelo modelo de CLP aumentou os níveis de AEA no hipotálamo, mas não alterou os níveis de 2-AG. Utilizando o modelo de endotoxemia, Fernandes-Solaris e colaboradores obtiveram resultados similares quando demonstraram que a injeção intraperitoneal de LPS (5 mg/kg) aumentou significativamente a síntese de AEA medida *ex-vivo* no hipotálamo 3 horas após os tratamentos (Fernandez-Solari *et al.*, 2006).

Além disso, 4 horas após a indução da sepse, o bloqueio central do receptor ET_A usando BQ123 restaurou os níveis de AEA como esperado. Estes dados sugerem que o aumento de eCB, e particularmente de AEA no hipotálamo de ratos, observado durante a sepse, deve-se a uma ação da ET-1 no hipotálamo de ratos. Portanto, os dados apresentados nesta segunda parte de nosso estudo estão de acordo com a hipótese proposta. Estes dados demonstram claramente a relação entre o sistema endotelinérgico e o sistema endocanabinóide no SNC durante a sepse.

O passo seguinte em nosso trabalho foi verificar se, *in vivo*, este aumento nos níveis centrais de eCB era responsável pela disfunção no sistema vasopressinérgico periférico, caracterizado pela hiperresponsividade deste sistema em alguns leitos vasculares. Assim, utilizando a termocâmara demonstramos que a injeção endovenosa de AVP promoveu uma redução da temperatura da cauda tanto em animais sham quanto em animais com sepse induzida por CLP. No entanto, em animais com sepse, a resposta de vasoconstrição na cauda do animal, 24 h após a indução da sepse, foi significativamente maior do que aquela observada em animais falso-operados imediatamente após a injeção do vasoconstritor. Este efeito ainda perdurou por cerca de 3 min enquanto que, os animais falso-operados já apresentam uma vasodilatação. Estes dados sugerem que a artéria caudal mostrou-se muito mais responsiva aos efeitos do AVP em animais com sepse, uma hiperresponsividade que já havíamos observado na aorta destes animais no mesmo tempo (24 h). O

tratamento dos animais com o antagonista de receptores CB₁ por via i.c.v 4 e 8 h após a CLP (portanto 20 e 16 h antes da injeção de AVP) aboliu esta resposta confirmando que a hiperreatividade dos vasos à AVP está relacionada com a ativação do sistema endocanabinóide no sistema nervoso central. Deste modo, estes resultados complementam a sequência de eventos propostos em nossa hipótese inicial correlacionando a liberação de eCB no SNC e sensibilidade dos vasos a AVP.

7. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nos permitem concluir que:

- O tratamento via oral com rimonabanto normalizou os níveis de biomarcadores de disfunção de órgãos, como lactato, LDH, glicose e CK-MK, em ratos com sepse que foi induzida por CLP, embora alguns sinais de severidade da sepse (leucopenia, menor contagem de plaquetas e níveis mais altos de NOx) permanecerem inalterados.
- O tratamento oral com rimonabanto também atenuou a hipercontratilidade induzida pela AVP, mas não afetou a hipocontratilidade induzida pela fenilefrina. Essa melhora na falência múltipla de órgãos pode estar relacionada à melhora na resposta dos vasos à AVP.
- O bloqueio central dos receptores CB₁ é benéfico durante a sepse induzida por CLP, porque impediu a mortalidade induzida por CLP.
- Durante a sepse, a liberação de ET-1 e eCBs, atuando nos receptores CB₁ e ET_A, respectivamente, induziu uma diminuição na temperatura da cauda, que nos sugere uma resposta febril, e essa diminuição na temperatura da cauda foi abolida tanto pela administração central de BQ 123 quanto pela administração de AM 251.
- Durante a sepse induzida por CLP, há um aumento nos níveis de AEA no hipotálamo, e este aumento é abolido pela administração central de BQ123, sugerindo uma relação entre o sistema eCB e endotelinérgico durante a indução de sepse por CLP.
- Durante a sepse induzida por CLP, em uma fase mais tardia, há uma hiperresponsividade da artéria caudal à AVP sugerindo uma disfunção neste sistema, e este aumento é abolido pela administração central de AM251, sugerindo uma relação entre o sistema eCB e vasopressinérgico durante esta resposta.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Embora estudos clínicos sejam necessários, deve-se considerar que o rimonabanto pode ser útil no tratamento de sepse. O rimonabanto foi previamente aprovado na Europa como uma droga anti-obesidade, mas tem sido associada a sérios efeitos colaterais que estão relacionados a distúrbios psiquiátricos, incluindo a indução de tendências suicidas. Outra opção de tratamento, é o bosentan, um antagonista não seletivo de receptores ET_A/ET_B , que já é utilizado na clínica para o tratamento de hipertensão arterial pulmonar. Portanto, o uso do bosentan ou do rimonabanto em unidades de terapia intensiva ou o desenvolvimento de análogos mais seguros em conjunto com abordagens terapêuticas convencionais podem auxiliar no tratamento da sepse.

REFERÊNCIAS

- Akca, S., Haji-Michael P., de Mendonça A., Suter P., Levi M., Vincent J.L. Time course of platelet counts in critically ill patients, *Critical Care Medicine*, v. 30 (4), p. 753-756, 2002.
- Alexander, S. P. H., Mathie, A., Peters, J. A. *Guide to Receptors and Channels (GRAC)*, 3rd edition, *British journal of pharmacology*, v. 153, p. 1-209, 2008.
- Aoyagi, T., Izumi Y., Hiroyama M., Matsuzaki T., Yasuoka Y., Sanbe A., Miyazaki H., Fujiwara Y., Nakayama Y., Kohda Y., Yamauchi J., Inoue T., Kawahara K., Saito H., Tomita K., Nonoguchi H., Tanoue A. Vasopressin regulates the renin-angiotensin-aldosterone system via V1a receptors in macula densa cells., *American journal of physiology. Renal physiology*, v. 295, p. 100-107, 2008.
- Audet, M., Bouvier, M. Restructuring G-Protein- Coupled Receptor Activation, *Cell*, v. 151, p. 14-23, 2012.
- Baek, J. H., Zheng Y., Darlington C. L., Smith P. F. Cannabinoid CB₂ receptor expression in the rat brainstem cochlear and vestibular nuclei, *Acta Otolaryngologica*, v. 128 (9), p. 961-967, 2008.
- Baker, C. C., Chaudry I. H, Gaines H. O., Baue A. E. Evaluation of factors affecting mortality rate after sepsis in a murine cecal ligation and puncture model, *Surgery*, v. 94 (2), p. 331-5, 1993.
- Barberis, C., Mouillac, B., Durroux, T. Structural bases of vasopressin/oxytocin receptor function, *The Journal of endocrinology*, v. 156 (2), p. 223-9, 1998.
- Baribeau, D. A., Anagnostou E. Oxytocin and vasopressin: linking pituitary neuropeptides and their receptors to social neurocircuits, *Frontiers in Neuroscience*, v. 9, 2015.
- Barrett, L. K., Orie N. N., Taylor V., Stidwill R. P., Clapp L. H. , Singer M. Differential effects of vasopressin and norepinephrine on vascular reactivity in a long-term rodent model of sepsis, *Critical Care Medicine*, v. 3(10), p. 2337-2343, 2007.
- Barton, M., Yanagisawa, M. Endothelin: 20 years from discovery to therapy, *Canadian journal of physiology and pharmacology*, v. 86 (8), p. 485-98, 2008.
- Battistini, B., Forget, M. A., Laight, D. Potential roles for endothelins in systemic inflammatory response syndrome with a particular relationship to cytokines, *Shock* , v. 5 (3), p. 167-183, 1996.
- Benamar, K. Yondorf M., Meissler J. J., Geller E. B., Tallarida R. J., Eisenstein T. K. , Adler M. W. A Novel Role of Cannabinoids: Implication in the Fever Induced by Bacterial Lipopolysaccharide, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 320 (3), p. 1127-1133, 2006.

- Benarroch, E. E. Oxytocin and vasopressin: Social neuropeptides with complex neuromodulatory functions, *Neurology*, v. 80 (16), p. 1521-1528, 2013.
- Benbenishty, J. Weissman C., Sprung C. L., Brodsky-Israeli M., Weiss Y. Characteristics of patients receiving vasopressors, *Heart and Lung, Journal of Acute and Critical Care*, v. 40 (3), p. 247-252, 2011.
- Bennett, T. Mahajan R. P., March J. E., Kemp P. A., Gardiner S. M. Regional and temporal changes in cardiovascular responses to norepinephrine and vasopressin during continuous infusion of lipopolysaccharide in conscious rats, *British Journal of Anaesthesia*, v. 93 (3), p. 400-407, 2004.
- Bernardelli, A., Da Silva R. C., Corrêa T., Da Silva-Santos J. E. Vasoplegia in sepsis depends on the vascular system, vasopressor, and time-point: a comparative evaluation in vessels from rats subjected to the cecal ligation puncture model, *Canadian journal of physiology and pharmacology*, v. 94, p. 1227-1236, 2016.
- Bichet, D. G. Central vasopressin: Dendritic and axonal secretion and renal actions, *Clinical Kidney Journal*, v. 7 (3), p. 242-247, 2014.
- Bomberg, H., Bierbach B., Flache S., Wagner I., Gläser L., Groesdonk H. V., Menger M. D., Schäfers H. J. Endothelin and vasopressin influence splanchnic blood flow distribution during and after cardiopulmonary bypass, *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, v. 145 (2), p. 539-547, 2013.
- Bone R. C. The pathogenesis of sepsis, *Ann Inter Med*, v.115, p. 457-469, 1991.
- Boogaard V. D., F. E., Schouten M., de Stoppelaar S. F., Roelofs J. J., Brands X., Schultz M. J., Van't Veer C., Van der Poll T. Thrombocytopenia impairs host defense during murine streptococcus pneumoniae pneumonia, *Critical Care Medicine*, v. 43 (3), p. 75-83, 2015.
- Bouallegue, A. Endothelin-1-induced signaling pathways in vascular smooth muscle cells, *Curr Vasc Pharmacology*, v. 5 (1), p. 45-52, 2007.
- Brauner, J. S., Rohde, L. E., Clausell, N. Circulating endothelin-1 and tumor necrosis factor-alpha: early predictors of mortality in patients with septic shock, *Intensive care medicine*, v. 26 (3), p. 305-313, 2000.
- Briley, E. M., Lolait S. J., Axelrod J., Felder C. C. The cloned vasopressin V1a receptor stimulates phospholipase A2, phospholipase C, and phospholipase D through activation of receptor-operated calcium channels, *Neuropeptides*, v. 27 (1), p. 63-74, 1994.
- Brooks, H. F., Osabutey C. K., Moss R. F., Andrews P. L., Davies D. C. Caecal ligation and puncture in the rat mimics the pathophysiological changes in human sepsis and causes multi-organ dysfunction, *Metabolic Brain Disease*, v. 22 (3-4), p. 353-373, 2007.
- Bryan, N. S., Grisham, M. B. Methods to detect nitric oxide and its metabolites in biological samples, *Free Radical Biology and Medicine*, v. 43 (5), p. 645-657,

2007.

Buras, J. A., Holzmann, B., Sitkovsky M. Animal models of sepsis: setting the stage, *Nature reviews. Drug discovery*, v. 4 (10), p. 854-65, 2005.

Burgdorff, A. M., Bucher, M., Schumann, J. Vasoplegia in patients with sepsis and septic shock: pathways and mechanisms, *Journal of International Medical Research*, v. 46 (4), p. 1303-1310, 2018.

Caraceni, P., Pertosa A. M., Giannone F., Domenicali M., Grattagliano I., Principe A., Mastroleo C., Perrelli M.G., Cutrin J., Trevisani F., Croci T., Bernardi M. Antagonism of the cannabinoid CB-1 receptor protects rat liver against ischaemia-reperfusion injury complicated by endotoxaemia, *Gut*, v. 58 (8), p. 1135-1143, 2009.

Castro R., Regueira T., Aguirre M. L., Llanos O. P., Bruhn A., Bugedo G., Dougnac A., Castillo L., Andresen M., H. G. An evidence-based resuscitation algorithm applied from the emergency room to the ICU improves survival of severe septic shock, *Minerva Anestesiologica*, v. 74 (6), p. 223-31, 2008.

Clark, S. R., Ma A. C., Tavener S. A., McDonald B., Goodarzi Z., Kelly M. M., Patel K. D., Chakrabarti S., McAvoy E., Sinclair G. D., Keys E. M., Allen-Vercoe E., Devinney R., Doig C. J., Green F. H., Kubes P. Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood, *Nature Medicine*, v. 13 (4), p. 463-469, 2007.

Cohen, J. The immunopathogenesis of sepsis., *Nature*, v. 420 (6917), p. 885–91, 2002.

Corrêa, P. B. , Pancoto J. A., de Oliveira-Pelegrin G. R., Cárnio E. C., Rocha M. J. Participation of iNOS-derived NO in hypothalamic activation and vasopressin release during polymicrobial sepsis, *Journal of neuroimmunology*, v. 183 (1-2), p. 17–25, 2007.

Cowley A. W. Jr., Quillen E. Q. Jr., Skelton M. M. Role of vasopressin in cardiovascular regulation, *Fed Proc*, v. 42 (15), p. 3170–6, 1993.

Crawley, J. N., Corwin R. L., Robinson J. K., Felder C. C., Devane W. A., Axelrod J. Anandamide, an endogenous ligand of the cannabinoid receptor, induces hypomotility and hypothermia in vivo in rodents, *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, v. 46 (4), p. 967–972, 1993.

Csóka, B., Németh Z. H., Mukhopadhyay P., Spolarics Z., Rajesh M., Federici S., Deitch E. A., Bátkai S., Pacher P., Haskó G. CB2 cannabinoid receptors contribute to bacterial invasion and mortality in polymicrobial sepsis, *PloS one*, v. 4 (7), p. 6409, 2009.

Davenport, A. P. International Union of Pharmacology. XXIX. Update on endothelin receptor nomenclature, *Pharmacological reviews*, v. 54 (2), p. 219–26, 2002.

De Backer, D., Biston P., Devriendt J., Madl C., Chochrad D., Aldecoa C.,

Brasseur A., Defrance P., Gottignies P, Vincent J. Comparison of dopamine and norepinephrine in the treatment of shock, *The New England journal of medicine*, v. 362 (9), p. 779–789, 2010.

De Laurentiis, A., Fernández Solari J., Mohn C., Zorrilla Zubilete M., Rettori V. Endocannabinoid system participates in neuroendocrine control of homeostasis, *Neuroimmunomodulation*, v. 17 (3), p. 153–6, 2010.

De Petrocellis, L., Cascio, M. G., Di Marzo, V. The endocannabinoid system: a general view and latest additions, *British journal of pharmacology*, v. 141 (5), p. 765–774, 2004.

Deitch, E. A. Rodent models of intra-abdominal infection, *Shock*, v. 24, p. 19–23, 2005.

Delano, M. J., Ward, P. A. Sepsis-induced immune dysfunction: Can immune therapies reduce mortality?, *Journal of Clinical Investigation*, v. 126 (1), p. 23–31, 2016.

Dellinger, R. P., Levy M. M., Rhodes A., Annane D., Gerlach H., Opal S. M., Sevransky J. E., Sprung C. L., Douglas I. S., Jaeschke R., Osborn T. M., Nunnally M. E., Townsend S. R., Reinhart K., Kleinpell R. M., Angus D. C., Deutschman C. S., Machado F. R., Rubenfeld G. D., Webb S., Beale R. J., Vincent J. L., Moreno R. Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock, *Intensive care medicine*, v. 39 (2), p. 165–228, 2013.

Dellinger, R. P. The surviving sepsis campaign : 2013 and beyond, v. 126 (10), p. 1803–1805, 2013.

Di Marzo, V., Melck D., Bisogno T., De Petrocellis L. Endocannabinoids: Endogenous cannabinoid receptor ligands with neuromodulatory action, *Trends in Neurosciences*, v. 12 p. 521–528, 1998.

Di Marzo, V., De Petrocellis L., Sepe N., Buono A. Biosynthesis of anandamide and related acylethanolamides in mouse J774 macrophages and N 18 neuroblastoma cells, *Biochemical Journal*, v. 316 (3), p. 977-984, 1996.

Di Marzo, V., Deutsch, D. G. Biochemistry of the endogenous ligands of cannabinoid receptors, *Neurobiology of disease*, v. 5, p. 386-404, 1998.

Ehrenreich, H., Anderson R. W., Fox C. H., Rieckmann P., Hoffman G. S., Travis W. D., Coligan J. E., Kehrl J. H., Fauci A. S. Endothelins, peptides with potent vasoactive properties, are produced by human macrophages, *The Journal of experimental medicine*, v. 172 (6), p. 1741-8, 1990.

Evora, P. R. B., Pearson P. J., Rodrigues A. J., Viaro F., Schaff H. V. Effect of arginine vasopressin on the canine epicardial coronary artery: experiments on V1-receptor-mediated production of nitric oxide, *Arquivos brasileiros de cardiologia*, v. 80 (5), p. 483-94, 2003.

Evora, P. R. B., Pearson, P. J., Schaff, H. V. Arginine Vasopressin Induces

Endothelium-dependent Vasodilatation of the Pulmonary Artery, *Chest*, v. 103 (4), p. 1241-1245, 1993.

Fabricio, A. S., Silva C. A., Rae G. A., D'Orléans-Juste P., Souza G. E. Essential role for endothelin ET(B) receptors in fever induced by LPS (E. coli) in rats, *British journal of pharmacology*, v. 125 (3), p. 542-8., 1998.

Fabricio, A. S., Rae G. A., D'Orléans-Juste P., Souza G. E. Endothelin-1 as a central mediator of LPS-induced fever in rats, *Brain Research*, v. 1066 (1-2), p. 92-100, 2005.

Federico, P., Malkinson T. J., Cooper K. E., Pittman Q. J., Veale W. L. Vasopressin perfusion within the medial amygdaloid nucleus attenuates prostaglandin fever in the urethane-anesthetized rat, *Brain Research*, v. 587, p. 319-326, 1992.

Feldeberg, W., Saxena P. N.. Fever produced by prostaglandin E1, *Physiol Rev*, v. 207, p. 547-556, 1971.

Fenhammar, J., Andersson A., Forestier J., Weitzberg E., Sollevi A., Hjelmqvist H., Frithiof R. Endothelin receptor a Antagonism attenuates renal medullary blood flow impairment in Endotoxemic pigs, *PLoS ONE*, v. 6 (7), p. e21534, 2011.

Fernandez-Solari, J., Prestifilippo J. P., Bornstein S. R., McCann S. M., Rettori V. Participation of the endocannabinoid system in the effect of TNF- α on hypothalamic release of gonadotropin-releasing hormone, *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 1088, p. 238-250, 2006.

Figueiredo, M. J., Soares D. M., Martins J. M., Machado R., Sorgi C. A., Faccioli L. H., Melo M. C., Malvar C., Souza G. E. Febrile response induced by cecal ligation and puncture (CLP) in rats: involvement of prostaglandin E2 and cytokines, *Medical microbiology and immunology*, v. 201(2), p. 219-29, 2012.

Fraga, D., Zanoni C. I., Rae G. A., Parada C. A., Souza G. E. Endogenous cannabinoids induce fever through the activation of CB1 receptors, *British journal of pharmacology*, v. 157(8), p. 1494-501, 2009.

Freund, T. F., Katona, I., Piomelli, D. Role of endogenous cannabinoids in synaptic signaling, *Physiological reviews*, v. 83 (3), p. 1017-66, 2003.

Funke, A., Berner R., Traichel B., Schmeisser D., Leititis J. U., Niemeyer C.M. Frequency, Natural Course, and Outcome of Neonatal Neutropenia, *Pediatrics*, v. 106 (1), p. 45-51, 2000.

Gabay, C., Kushner, I. Acute-Phase Proteins and Other Systemic Responses to Inflammation, *The New England journal of medicine*, v. 340 (6), p. 448-54, 1999.

Gaieski, D. F., Edwards J. M., Kallan M. J., Carr B. G. Benchmarking the incidence and mortality of severe sepsis in the United States, *Critical care medicine*, v. 41 (5), p. 1167-74, 2013.

Galgglje, S., Mary S., Marchand J., Dussossoy D., Carrière D., Carayon P., Bouaboula M., Shire D., Le Fur G., Casellas P. Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations, *Biochemistry*, v. 61, p. 54–61, 1995.

Ghosh, S., Latimer R. D., Gray B. M., Harwood R. J., Oduro A. Endotoxin-induced organ injury, *Crit Care Med.*, v. 21, p. 19–24, 1993.

Giaid, A., Gibson S. J., Herrero M. T., Gentleman S., Legon S., Yanagisawa M., Masaki T., Ibrahim N. B., Roberts G. W., Rossi M. L, Topographical localisation of endothelin mRNA and peptide immunoreactivity in neurones of the human brain, *Histochemistry*, v. 95 (3), p. 303–314, 1991.

Gimpl, G., Fahrenholz, F., Gene, C. The Oxytocin Receptor System : Structure , Function , and Regulation, v. 81 (2), p. 629–684, 2001.

Goparaju, S. K., Ueda N., Taniguchi K., Yamamoto S. Enzymes of porcine brain hydrolyzing 2-arachidonoylglycerol, an endogenous ligand of cannabinoid receptors, *Biochemical pharmacology*, v. 57 (4), p. 417–23, 1999.

Gordon, A. C., Mason A. J., Thirunavukkarasu N., Perkins G. D., Cecconi M., Cepkova M., Pogson D. G., Aya H. D., Anjum A., Frazier G. J., Santhakumaran S., Ashby D., Brett S. J. Effect of Early Vasopressin vs Norepinephrine on Kidney Failure in Patients With Septic Shock The VANISH Randomized Clinical Trial, *JAMA - Journal of the American Medical Association*, v. 316 (5), p. 509–18, 2016.

Gordon, C. J. Thermal biology of the laboratory rat, *Physiology & behavior*, v. 47 (5), p. 963–91, 1990.

Guarido, K. L., Gonçalves R. P., Júnior A. G., da Silva-Santos J. E. Increased activation of the Rho-A/Rho-Kinase pathway in the renal vascular system is responsible for the enhanced reactivity to exogenous vasopressin in endotoxemic rats, *Critical Care Medicine*, v. 42 (6), p. 461–471, 2014.

Hashimotodani, Y., Ohno-Shosaku, T., Kano, M. Endocannabinoids and synaptic function in the CNS, *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry*, v. 13 (2), p. 127–37, 2007.

Herkenham, M., Lynn A. B., Little M. D., Johnson M. R., Melvin L. S., de Costa B. R., Rice K. C. Cannabinoid receptor localization in brain, v. 87 (5), p. 1932–1936, 1990.

Hirata, Y., Yoshimi H., Takata S., Watanabe T. X., Kumagai S., Nakajima K., Sakakibara S. Cellular mechanism of action by a novel vasoconstrictor endothelin in cultured rat vascular smooth muscle cells, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 154 (3), p. 868–875, 1988.

Ho J. T., Chapman M. J., O'Connor S., Lam S., Edwards J., Ludbrook G., Lewis J.G., Torpy D. J. Characteristics of plasma NOx levels in severe sepsis: high interindividual variability and correlation with illness severity, but lack of correlation with cortisol levels, *Crit Care Med.*, v. 73, p. 413–420, 2010.

Hoffman, A. F., Lupica, C. R. Mechanisms of cannabinoid inhibition of GABA(A) synaptic transmission in the hippocampus, *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, v. 20 (7), p. 2470–9, 2000.

Holmes, C. L., Walley K. R., Chittock D. R., Lehman T., Russell J. A. The effects of vasopressin on hemodynamics and renal function in severe septic shock: a case series, *Intensive Care Medicine*, v. 27 (8), p. 1416–1421, 2001.

Holmes, C. L., Landry, D. W., Granton, J. T. Science review: Vasopressin and the cardiovascular system part 1--receptor physiology, *Critical care (London, England)*, v. 7 (6), p. 427–34, 2003.

Holmes, C. L., Landry, D. W., Granton, J. T. Science Review: Vasopressin and the cardiovascular system part 2 - clinical physiology, *Critical care (London, England)*, v. 8 (1), p. 15–23, 2004.

Holmes, C. L., Walley, K. R. Vasoactive drugs for vasodilatory shock in ICU, *Current Opinion in Critical Care*, v. 15 (5), p. 398–402, 2009.

Hotchkiss, R. S., Moldawer L. L., Opal S. M., Reinhart K., Turnbull I. R., Vincent J. L. Sepsis and septic shock, *Nature Reviews Disease Primers*, v. 2, p. 1-47. 2017.

Howlett, A. C. International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of Cannabinoid Receptors, *Pharmacological Reviews*, v. 54 (2), p. 161–202, 2002.

Hrabovszky, E., Liposits, Z. Novel aspects of glutamatergic signalling in the neuroendocrine system, *Journal of neuroendocrinology*, v. 20 (6), p. 743–51, 2008.

Inoue, A., Yanagisawa M., Kimura S., Kasuya Y., Miyauchi T, Goto K., Masaki T. The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 86 (8), p. 2863–7, 1989.

Inoue, T., Nonoguchi, H., Tomita, K. Physiological effects of vasopressin and atrial natriuretic peptide in the collecting duct, *Cardiovascular research*, v. 51(3), p. 470–80, 2001.

Iskit, A. B., Senel I., Sokmensuer C., Guc M. O. Endothelin receptor antagonist bosentan improves survival in a murine caecal ligation and puncture model of septic shock, *European journal of pharmacology*, v. 506 (1), p. 83–8, 2004.

Iwashyna T. J., Ely E. W., Smith D. M., Langa. K. M. Long-term cognitive impairment and functional disability among survivors of severe sepsis, *Jama*, v. 304 (16), p. 1787–1794, 2010.

Jourdain, P., Israel J. M., Dupouy B., Oliet S. H., Allard M., Vitiello S., Theodosis D.T., Poulain D. A. Evidence for a hypothalamic oxytocin-sensitive pattern-generating network governing oxytocin neurons in vitro, *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, v. 18 (17), p. 6641-9, 1998.

Kaddoura, S., Curzen N. P., Evans T. W., Firth J. D., Poole-Wilson P. A. Tissue expression of endothelin-1 mRNA in endotoxaemia, *Biochemical and biophysical research communications*, v. 218 (3), p. 641–7, 1996.

Kadoi, Y., Saito S., Kunimoto F., Imai T., Fujita T. Impairment of the brain beta-adrenergic system during experimental endotoxemia, *The Journal of surgical research*, v. 61 (2), p. 496–502, 1996.

Kadoi, Y., Goto, F. Selective inducible nitric oxide inhibition can restore hemodynamics, but does not improve neurological dysfunction in experimentally-induced septic shock in rats, *Anesthesia and Analgesia*, v. 99 (1), p. 212-220, 2014.

Kadoi, Y., Goto, F. Effects of AM281, a cannabinoid antagonist, on circulatory deterioration and cytokine production in an endotoxin shock model: Comparison with norepinephrine, *Journal of Anesthesia*, v. 20 (4), p. 284-289, 2006.

Kahn, C. B. Lactate Measurements in Sepsis-Induced Tissue Hypoperfusion: Results From the Surviving Sepsis Campaign Database, *The Journal of Emergency Medicine*, v. 49 (2), p. 255-256, 2015.

Kampmeier, T. G., Rehberg S., Westphal M., Lange M. Vasopressin in sepsis and septic shock, *Minerva anesthesiologica*, v. 76 (10), p. 844-50, 2010.

Kaszaki, J., Wolfárd A., Boros M., Baranyi L., Okada H., Nagy S. Effects of antiendothelin treatment on the early hemodynamic changes in hyperdynamic endotoxemia, *Acta chirurgica Hungarica*, v. 36 (1-4), p. 152-153, 1997.

Katchan, V., David, P., Shoenfeld, Y. Cannabinoids and autoimmune diseases: A systematic review, *Autoimmunity Reviews*, v. 15(6), p. 513-528, 2016.

Khodorkovsky, B., Youssef E., Adamakos F., Cina T., Falco A., LaMura L., Marion A., Nathan S, Hahn B. Does Initial Temperature in the Emergency Department Predict Outcomes in Patients Admitted for Sepsis?, *Journal of Emergency Medicine*, v. 55 (3), p. 372-377, 2018.

Kienbaum, P., Prante C., Lehmann N., Sander A., Jalowy A., Peters J. Alterations in forearm vascular reactivity in patients with septic shock, *Anaesthesia*, v. 63 (2), p. 121-128, 2008.

Kluger M. J. Fever: role of pyrogens and cryogens, *Physiol Rev*, v. 71, p. 93-127, 1991.

Koedel, U., Gorriz C., Lorenzl S., Pfister H. W. Increased Endothelin Levels in Cerebrospinal Fluid Samples from Adults with Bacterial Meningitis, *Clinical Infectious Diseases*, v. 25 (2), p. 329–330, 1997.

Koseki, C., Imai M., Hirata Y., Yanagisawa M., Masaki T. Autoradiographic distribution in rat tissues of binding sites for endothelin: a neuropeptide?, *Am J Physiol*, v. 256, p. 858-66, 1989.

Kotsovolis, G., Kallaras, K. The role of endothelium and endogenous vasoactive

substances in sepsis, *Hippokratia*, v. 14 (2), p. 88-93, 2010.

Kowalczyk, A., Kleniewska P., Kolodziejczyk M., Skibska B., Goraca A. The role of endothelin-1 and endothelin receptor antagonists in inflammatory response and sepsis, *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, v. 63 (1), p. 41-52, 2015.

Lafreniere D. , J., Lehmann, C. Parameters of the endocannabinoid system as novel biomarkers in sepsis and septic shock, *Metabolites*, v. 7(4), p. 55, 2017.

Landry, D. W., Oliver, J. A. The pathogenesis of vasodilatory shock, *The New England journal of medicine*, v. 345 (8), p. 588-595, 2001.

Leite-Avalca, M. C. G., Lomba L. A., Bastos-Pereira A. L., Brito H. O., Fraga D., Zamprônio A. R. Involvement of Central Endothelin et A and Cannabinoid CB 1 Receptors and Arginine Vasopressin Release in Sepsis Induced by Cecal Ligation and Puncture in Rats, *Shock*, v. 46 (3), p. 290-296, 2016.

Lelubre, C., Vincent, J. L. Mechanisms and treatment of organ failure in sepsis, *Nature Reviews Nephrology.*, v. 14 (7), p. 417-427, 2018.

Leone, M., Albanèse J., Delmas A., Chaabane W., Garnier F., Martin C. *Terlipressin in catecholamine-resistant septic shock patients.*, *Shock*, v. 22 (4), p. 314-9, 2004.

Leone, M., Boyle, W. A. Decreased vasopressin responsiveness in vasodilatory septic shock-like conditions, *Critical Care Medicine*, v. 34 (4), p. 1126-1130, 2006.

Levin, E. R. Mechanisms of Disease: Endothelins, *New England Journal of Medicine*, v. 333 (6), p. 356-363, 1995.

Levy, B. Lactate and shock state: The metabolic view, *Current Opinion in Critical Care*, v. 12 (4), p. 315-321, 2006.

Levy, B. Vascular hyporesponsiveness to vasopressors in septic shock: from bench to bedside, *Intensive Care Med*, v. 36, p. 2019-2029, 2010.

Levy, B., Fritz C., Tahon E., Jacquot A., Auchet T., Kimmoun A. Vasoplegia treatments: The past, the present, and the future, *Critical Care*. Critical Care, v. 22 (1), p. 1-11, 2018.

Levy, M. M., Fink M. P., Marshall J. C., Abraham E., Angus D., Cook D., Cohen J., Opal S. M., Vincent J. L., Ramsay G. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference, *Intensive care medicine*, v. 29 (4), p. 530-8, 2003.

Levy, M. M., Evans, L. E., Rhodes, A. The Surviving Sepsis Campaign Bundle: 2018 update, *Intensive Care Medicine*, v. 46 (6), p. 997-1000, 2018.

Lin, C. L., Jeng A. Y., Howng S. L., Kwan A. L. Endothelin and subarachnoid hemorrhage-induced cerebral vasospasm: pathogenesis and treatment, *Curr Med Chem*, v. 11 (13), p. 1779-1791, 2004.

Liu, E., Lewis K., Al-Saffar H., Krall C. M., Singh A., Kulchitsky V. A., Corrigan J. J., Simons C. T., Petersen S. R., Musteata F. M., Bakshi C. S., Romanovsky A. A., Sellati T. J., Steiner A. A. Naturally occurring hypothermia is more advantageous than fever in severe forms of lipopolysaccharide- and Escherichia coli-induced systemic inflammation, *AJP: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, v. 302 (12), p. 1372-1383, 2012.

Lorente, J. A., Landín L., De Pablo R., Renes E., Liste D. L-arginine pathway in the sepsis syndrome, *Crit Care Med.*, v. 21 (9), p. 1287-95, 1993.

Luce, V., Fernandez Solari J., Rettori V., De Laurentiis A. The inhibitory effect of anandamide on oxytocin and vasopressin secretion from neurohypophysis is mediated by nitric oxide, *Regulatory Peptides*, v. 188, p. 31-39, 2013.

Ludwig, M., Leng, G. Dendritic peptide release and peptide-dependent behaviours, *Nature reviews. Neuroscience*, v. 7, p. 126-136, 2006.

Luft, F. C. Lactic acidosis update for critical care clinicians, *J Am Soc Nephrol*, v. 12, p. 15-9, 2001.

Lundberg, O. H. M., Bergenzaun L., Rydén J., Rosenqvist M., Melander O., Chew M.S. Adrenomedullin and endothelin-1 are associated with myocardial injury and death in septic shock patients, *Critical Care*, v. 20 (1), p. 178, 2016.

Lutz, B. Molecular biology of cannabinoid receptors, *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids*, v. 66 (2-3), p. 123-42, 2002.

MacCumber, M. W., Ross C. A., Glaser B. M., Snyder S. H. Endothelin: visualization of mRNAs by in situ hybridization provides evidence for local action, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 86 (18), p. 7285-9, 1989.

Maitra, S. R., Wojnar, M. M., Charles H. Lang. Alterations in tissue glucose uptake during the hyperglycemic and hypoglycemic phases of sepsis, *Shock*, v. 13 (5), p. 379-385, 2000.

Malek, N., Popiolek-Barczyk K., Mika J., Przewlocka B., Starowicz K. Anandamide, acting via CB2 receptors, alleviates LPS-induced neuroinflammation in rat primary microglial cultures, *Neural Plasticity*, 2015.

Martin, G. S., Mannino, D. M., Moss, M. The effect of age on the development and outcome of adult sepsis, *Critical Care Medicine*, v. 34 (1), p. 15-21, 2006.

Matsuda, L. A., Lolait S. J., Brownstein M. J., Young A. C., Bonner T. I. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA, *Nature*, v. 346 (6284), p. 561-564, 1990.

Matsumoto, H., Matsumoto H., Suzuki N., Onda H., Fujino M. Abundance of endothelin-3 in rat intestine, pituitary gland and brain, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 164 (1), p. 74-80, 1989.

McCarron, R. M., Wang L., Stanimirovic D. B., Spatz M. Endothelin induction of

adhesion molecule expression on human brain microvascular endothelial cells, *Neurosci Lett*, v. 156 (1-2), p. 31–34, 1993.

McDonald, B., Urrutia R., Yipp B. G., Jenne C. N., Kubes P. Intravascular neutrophil extracellular traps capture bacteria from the bloodstream during sepsis, *Cell Host and Microbe*, v. 12 (3), p. 324-333, 2012.

Mechoulam, R., Ben-Shabat S., Hanus L., Ligumsky M., Kaminski N. E., Schatz A. R., Gopher A., Almog S., Martin B. R., Compton D. R. Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors, *Biochemical pharmacology*, v. 50 (1), p. 83-90, 1995.

Mechoulam, R., Hanuš L. O., Pertwee R. , Howlett A. C. Early phytocannabinoid chemistry to endocannabinoids and beyond, *Nature Reviews Neuroscience*. v. 15 (11), p. 757-764.

Memetimin, H., Izumi Y., Nakayama Y., Kohda Y., Inoue H., Nonoguchi H., Tomita K. Low pH stimulates vasopressin V2 receptor promoter activity and enhances downregulation induced by V1a receptor stimulation, *American journal of physiology. Renal physiology*, v. 297 (3), p. 620-8, 2009.

Mercier, O., Sage E., Izziki M., Humbert M., Darteville P., Eddahibi S., Fadel E. Endothelin A receptor blockade improves regression of flow-induced pulmonary vasculopathy in piglets, *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*. The American Association for Thoracic Surgery, v. 140 (3), p. 677-683, 2010.

Miller, R. D., Monsul N. T., Vender J. R., Lehmann J. C. NMDA- and endothelin-1 -induced increases in blood-brain barrier permeability quantitated with Lucifer yellow, *Journal of the Neurological Sciences*, v. 136, p. 37-40, 1996.

Moos, F. C., Rossi, K., Richard, P. Activation of N-methyl-D-aspartate receptors regulates basal electrical activity of oxytocin and vasopressin neurons in lactating rats, *Neuroscience*, v. 77 (4), p. 993-1002, 1997.

Moraes R. B., , Boniatti M. M., Cardoso P. R. C., Barros T. L. E. Medicina Intensiva. Artmed Editora, 2014.

Munro, S., Thomas, K. L., Abu-Shaar, M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids, *Nature*, v. 365 (6441), p. 61-65, 1993.

Nakanishi, K., Mattson D. L., Gross V., Roman R. J., Cowley A. W. Jr. Control of renal medullary blood flow by vasopressin V1 and V2 receptors, *Am J Physiol*, v. 269, p. 193-200, 1995.

Narushima, I., Kita T., Kubo K., Yonetani Y., Momochi C., Yoshikawa I., Ohno N., Nakashima T. Highly enhanced permeability of blood-brain barrier induced by repeated administration of endothelin-1 in dogs and rats, *Pharmacology and Toxicology*, v. 92 (1), p. 21-26, 2003.

Naylor, A. M., Pittman Q.J., Veale W. L. Stimulation of vasopressin release in the ventral septum of the rats brain suppresses endotoxin fever, *J. Physiol.*, v. 399, p. 177-189, 1988.

Neumann, I. D., Landgraf, R. Balance of brain oxytocin and vasopressin: Implications for anxiety, depression, and social behaviors, *Trends in Neurosciences*, v. 35 (11), p. 649-659, 2012.

Nissen, R., Hu, B., Renaud, L. P. Regulation of spontaneous phasic firing of rat supraoptic vasopressin neurones in vivo by glutamate receptors, *The Journal of physiology*, v. 484 , p. 415-24, 1995.

Noe, S. N. Newton C., Widen R., Friedman H., Klein T.W. Anti-CD40, anti-CD3, and IL-2 stimulation induce contrasting changes in CB1 mRNA expression in mouse splenocytes, *Journal of Neuroimmunology*, v. 110 (1–2), p. 161-167, 2000.

O'Brien, J. M., Ali N. A., Aberegg S. K., Abraham E. Sepsis, *The American Journal of Medicine*, v. 112 (12), p. 1012-1022, 2007.

Osuchowski, M. F., Connett J., Welch K., Granger J., Remick D. G. Stratification is the key: Inflammatory biomarkers accurately direct immunomodulatory therapy in experimental sepsis, *Critical Care Medicine*, v. 37 (5), p. 1567-1573, 2009.

Papadopoulos, M. C., Davies D. C., Moss R. F., Tighe D., Bennett E. D. Pathophysiology of septic encephalopathy: A review, *Critical Care Medicine*, v. 28(8), p. 3019-3024, 2000.

Papassotiriou, J. Immunoluminometric Assay for Measurement of the C-Terminal Endothelin-1 Precursor Fragment in Human Plasma, *Clinical Chemistry*, v. 52 (6), p. 1144-1151, 2006.

Patel, S. Differential Regulation of the Endocannabinoids Anandamide and 2-Arachidonylglycerol within the Limbic Forebrain by Dopamine Receptor Activity, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 306 (3), p. 880-888, 2003.

Patel, S., Carrier E. J., Ho W. S., Rademacher D. J., Cunningham S., Reddy D. S., Falck J. R., Cravatt B. F., Hillard C. J. The postmortal accumulation of brain *N* -arachidonylethanolamine (anandamide) is dependent upon fatty acid amide hydrolase activity, *Journal of Lipid Research*, v. 46 (2), p. 342-349, 2005.

Paxinos G., Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. San Diego, 2010.

Pertwee, R. G. Pharmacological actions of cannabinoids Pharmacological actions of cannabinoids, *In Handb Exp Pharmacol.*, p. 1-51, 2005.

Pertwee, R. G., Howlett A. C., Abood M. E., Alexander S. P., Di Marzo V., Elphick M. R., Greasley P. J., Hansen H. S., Kunos G., Mackie K., Mechoulam R., Ross R.A. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIX. Cannabinoid receptors and their ligands: beyond CB₁ and CB₂, *Pharmacological reviews*, v. 62 (4), p. 588-631, 2010.

Pertwee, R. G. and Ross, R. A. Cannabinoid receptors and their ligands.', *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids*, v. 66 (2–3), p. 101-21,

2002.

Piechota-Polańczyk, A., Gorąca, A. Influence of specific endothelin-1 receptor blockers on hemodynamic parameters and antioxidant status of plasma in LPS-induced endotoxemia, *Pharmacological Reports*, v. 64 (6), p. 1434-1441, 2012.

Piechota, M., Banach M., Irzmanski R., Barylski M., Piechota-Urbanska M., Kowalski J., Pawlicki L. Plasma endothelin-1 levels in septic patients, *Journal of Intensive Care Medicine*, v. 22 (4), p. 232-239, 2007.

Pow, D. V., Morris, J. F. Dendrites of hypothalamic magnocellular neurons release neurohypophysial peptides by exocytosis, *Neuroscience*, v. 32 (2), pp. 435-439, 1989.

Quezado, Z., Parent C., Karzai W., Depietro M., Natanson C., Hammond W., Danner R. L., Cui X., Fitz Y., Banks S. M., Gerstenberger E., Eichacker P. Q. Acute G-CSF therapy is not protective during lethal E. coli sepsis, *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, v. 281 (4), p. 1177-85, 2001.

Revelly, J. P., Tappy L., Martinez A., Bollmann M., Cayeux M. C., Berger M, M., Chioléro R. L. Lactate and glucose metabolism in severe sepsis and cardiogenic shock, *Critical Care Medicine*, v. 33 (10), p. 2235-2240, 2005.

Rey, C., García-Hernández I., Concha A., Martínez-Cambor P., Botrán M., Medina A., Prieto B., López-Herce J. Pro-adrenomedullin, pro-endothelin-1, procalcitonin, C-reactive protein and mortality risk in critically ill children: a prospective study, *Critical care*, v. 17 (5), p. 240, 2013.

Rhodes, A., Evans L. E., Alhazzani W., Levy M. M., Antonelli M., Ferrer R., Kumar A., Sevransky J. E., Sprung C. L., Nunnally M. E., Rochwerg B., Rubenfeld G. D., Angus D. C., Annane D., Beale R. J., Bellingham G. J., Bernard G. R., Chiche J. D., Coopersmith C., De Backer D. P., French C. J., Fujishima S., Gerlach H., Hidalgo J. L., Hollenberg S. M., Jones A. E., Karnad D. R., Kleinpell R. M., Koh Y., Lisboa T. C., Machado F. R., Marini J. J., Marshall J. C., Mazuski J. E., McIntyre L. A., McLean A. S., Mehta S., Moreno R. P., Myburgh J., Navalesi P., Nishida O., Osborn T. M., Perner A., Plunkett C. M., Ranieri M., Schorr C. A., Seckel M. A., Seymour C. W., Shieh L., Shukri K. A., Simpson S. Q., Singer M., Thompson B. T., Townsend S. R., Van der Poll T., Vincent J. L., Wiersinga W. J., Zimmerman J. L., Dellinger R. P. Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock: 2016, *Critical Care Medicine*, v. 43 (3), p. 304-377 2017.

Rittirsch, D., Huber-Lang, M. S., Flierl M. A., Ward P. A. Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture, *Nature Protocols*, v. 4 (1), p. 31-36, 2009.

Romanovsky, A. A., Almeida M. C., Aronoff D. M., Ivanov A. I., Konsman J. P., Steiner A. A., Turek V. F. Fever and hypothermia in systemic inflammation: recent discoveries and revisions, *Frontiers in Bioscience*, v. 10, p. 2193-2216, 2005.

Ross, E. A. Congestive renal failure: The pathophysiology and treatment of renal

venous hypertension, *Journal of Cardiac Failure.* , v. 18 (12), p. 930-938, 2012.

Ross, R. A., Coutts A. A., McFarlane S. M. , Anavi-Goffer S. , Irving A. J., Pertwee R. G., MacEwan D. J., Scott R. H. Actions of cannabinoid receptor ligands on rat cultured sensory neurones: Implications for antinociception, *Neuropharmacology*, v. 40 (2), p. 221-232, 2001.

Rubanyi GM1, P. M. Endothelins: molecular biology, biochemistry, pharmacology, physiology, and pathophysiology, *Pharmacological Reviews*, v. 46 (3), p. 325-415, 1994.

Rullman, E., Gustafsson, T., Ahlborg, G. The impact of the endothelin type A receptor on regional endothelin-1 turnover, in particular renal endothelin-1 release, in humans, *Journal of applied physiology* , v. 108 (6), p. 1625-30, 2010.

Russell, J. A. Vasopressin in vasodillatory and septic shock, *Current Opinion in Critical Care*, v. 13 (4), p. 383-391, 2007.

Russel J. A., Walley K. R., Singer J., Gordon A. C., Hébert P. C., Cooper D. J., Holmes C. L., Mehta S. , Granton J. T., Storms M. M., Cook D. J., Presneill J. J., Ayers D. Vasopressin versus Norepinephrine Infusion in Patients with Septic Shock, *The New England journal of medicine*, v. 358, p. 9.

Sai, Y., Okamura T, Amakata Y, Toda N. Comparison of responses of canine pulmonary artery and vein to angiotensin II, bradykinin and vasopressin, *European Journal of Pharmacology*, v. 282 (1–3), p. 235-241, 1995.

Schrier, R. W., Berl, T., Anderson, R. J. Osmotic and nonosmotic control of vasopressin release, *The American journal of physiology*, v. 236 (4), p. 321-332, 1979.

Schuetz, P., Christ-Crain M., Morgenthaler N. G., Struck J., Bergmann A., Müller B. Circulating precursor levels of endothelin-1 and adrenomedullin, two endothelium-derived, counteracting substances, in sepsis, *Endothelium: Journal of Endothelial Cell Research*, v. 14 (6), p. 345-351, 2007.

Schuuring, M. J., Vis J. C., Van Dijk A. P., Van Melle J. P., Vliegen H. W., Pieper P. G., Sieswerda G. T., de Bruin-Bon R. H., Mulder B. J., Bouma B. J. Impact of bosentan on exercise capacity in adults after the Fontan procedure: A randomized controlled trial, *European Journal of Heart Failure*, v. 15 (6), p. 690-698, 2013.

Schwarting, A., Schwarting A., Schlaak J., Lotz J., Pfers I., Meyer zum Büschenfelde K. H., Mayet W. J. Endothelin-1 modulates the expression of adhesion molecules on fibroblast-like synovial cells (FLS), *Scandinavian Journal of Rheumatology*, v. 25(4), p. 246-256, 1996.

Shalansky, S. J., Verma A. K., Levine M., Spinelli J. J., Dodek P. M. Risk markers for thrombocytopenia in critically ill patients: a prospective analysis, *Pharmacotherapy*, v. 22 (7), p. 803-813, 2002.

Sharma, A. C., Motew S. J., Farias S., Alden K. J., Bosmann H. B., Law W.

R., Ferguson J. L. Sepsis alters myocardial and plasma concentrations of endothelin and nitric oxide in rats, *Journal of molecular and cellular cardiology*, v. 29 (5), p. 1469 - 77, 1997.

Sharma, B., Sharma M., Majumder M., Steier W., Sangal A., Kalawar M. Thrombocytopenia in septic shock patients - a prospective observational study of incidence, risk factors and correlation with clinical outcome, *Anaesthesia and Intensive Care*, v. 35 (6), p. 874-880, 2007.

Share L. Role of Vasopressin in Cardiovascular Regulation, *Physiological reviews*, v. 64 (4), p. 1248-1273, 1988.

Sharshar, T., Carlier R., Blanchard A., Feydy A., Gray F., Paillard M., Raphael J. C., Gajdos P., Annane D. Depletion of neurohypophyseal content of vasopressin in septic shock, *Critical Care Medicine*, v. 30 (3), p. 497-500, 2002.

Sharshar, T., Blanchard A., Paillard M., Raphael J. C., Gajdos P., Annane D. Circulating vasopressin levels in septic shock, *Critical Care Medicine*, v. 31 (6), p. 1752-1758, 2003.

Sheehan, M., Wong, H. R. Yet another potential role for nitric oxide in the pathophysiology of septic shock, *Critical Care Medicine*, v. 30 (6), p. 1393-4, 2002.

Shibuya, I., Kabashima N., Ibrahim N., Setiadji S. V. , Ueta Y., Yamashita H. Pre- and postsynaptic modulation of the electrical activity of rat supraoptic neurones, *Experimental physiology*, 85, p. 145-151, 2000.

Siami, S., Polito A., Porcher R., Hissem T., Blanchard A., Boucly C., Carlier R., Annane D., Haymann J. P., Sharshar T. Thirst perception and osmoregulation of vasopressin secretion are altered during recovery from septic shock, *PloS one*, v. 8 (11), p. 80190, 2013.

Van Sickle, M. D., Duncan M., Kingsley P. J. , Mouihate A., Urbani P., Mackie K., Stella N., Makriyannis A., Piomelli D., Davison J. S., Marnett L. J., Di Marzo V., Pittman Q. J., Patel K. D., Sharkey K. A. Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB2 receptors, *Science*, v. 310 (5746), p. 329-332, 2005.

Singer, M., Singer M., Deutschman C. S., Seymour C. W., Shankar-Hari M., Annane D., Bauer M., Bellomo R., Bernard G. R., Chiche J. D., Coopersmith C. M., Hotchkiss R. S., Levy M. M., Marshall J. C., Martin G. S., Opal S. M., Rubenfeld G. D., Van der Poll T., Vincent J. L. , Angus D. C. The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (sepsis-3), *JAMA - Journal of the American Medical Association*, v. 315 (8), p. 801-810, 2016.

Skaper, S. D., Buriani A., Dal Toso R., Petrelli L., Romanello S., Facci L., Leon A. The ALIAmide palmitoylethanolamide and cannabinoids, but not anandamide, are protective in a delayed postglutamate paradigm of excitotoxic death in cerebellar granule neurons, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 93 (9), p. 3984-9, 1996..

Ślusarz, M. J. Vasopressin V1a and V1b receptor modulators: a patent review (2012 - 2014), *Expert opinion on therapeutic patents*, v. 25 (6), p. 711-22, 2015.

Speciale, L., Roda K., Saresella M., Taramelli D., Ferrante P. Different endothelins stimulate cytokine production by peritoneal macrophages and microglial cell line, *Immunology*, v. 93 (1), p. 109-114, 1998.

Stella N., Piomelli, D. Receptor-dependent formation of endogenous cannabinoids in cortical neurons, *European Journal of Pharmacology*, v. 425 (3), p. 189-96, 2001.

Stoop, R. Neuromodulation by Oxytocin and Vasopressin, *Neuron*, v. 76 (1), p. 142-159, 2012.

Sugiura, T., Kishimoto S., Oka S., Gokoh M. Biochemistry, pharmacology and physiology of 2-arachidonoylglycerol, an endogenous cannabinoid receptor ligand, *Progress in lipid research*, v. 45 (5), p. 405-46, 2006.

Surks, H. K. Regulation of Myosin Phosphatase by a Specific Interaction with cGMP- Dependent Protein Kinase I, *Science*, v. 286 (5444), p. 1583-1587, 1999.

Torres-Dueñas, D., Benjamim C. F., Ferreira S. H., Cunha F. Q. *et al.* Failure of neutrophil migration to infectious focus and cardiovascular changes on sepsis in rats: Effects of the inhibition of nitric oxide production, removal of infectious focus, and antimicrobial treatment, *Shock* , v. 25 (3), p. 267-76, 2006.

Tsiotou, A. G., Sakorafas G. H., Anagnostopoulos G., Bramis J. Septic shock: current pathogenetic concepts from a clinical perspective, *Medical Science Monitor*, v. 11 (3), p. 76-85, 2005.

Vanderschueren M., Malbrain, M., Vankerschaever, D., Frans, E., Wilmer, A., Bobbaers, H. Thrombocytopenia and prognosis in intensive care, *Crit Care Med*, v. 28 (6), p. 1871-1876, 2000.

Vincent, J. L. Cardiovascular alterations in septic shock, *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, v. 41, p. 9-15, 1998.

Vincent J. L., De Backer, D. Circulatory shock, *New England Journal of Medicine*, v. 369, p. 1726-1734, 2013.

Vincent, J. L., Sakr Y., Sprung C. L., Ranieri V. M., Reinhart K., Gerlach H., Moreno R., Carlet J., Le Gall J. R., Payen D. Sepsis in European intensive care units: Results of the SOAP study, *Critical Care Medicine*, v. 34 (2), p. 344-353, 2006.

Voerman, H. J., Stehouwer C. D., Van Kamp G. J., Strack van Schijndel R. J., Groeneveld A. B., Thijs L. G. Plasma endothelin levels are increased during septic shock, *Critical care medicine*, v. 20 (8), p. 1097-1101, 1992.

Wagner, J. A., Varga K., Ellis E. F., Rzigalinski B. A., Martin B. R., Kunos G. Activation of peripheral CB1 cannabinoid receptors in haemorrhagic shock, *Nature*, v. 390 (6659), p. 518-521, 1997.

Wagner, J., Hu K., Bauersachs J., Karcher J., Wiesler M., Goparaju S. K., Kunos G., Ertl G. Endogenous cannabinoids mediate hypotension after experimental myocardial infarction, *Journal of the American College of Cardiology*, v. 38 (7), p. 2048-54, 2001.

Wagner, J. a, Varga, K., Kunos, G. Cardiovascular actions of cannabinoids and their generation during shock, *Journal of molecular medicine*, v. 76 (12), p. 824-36, 1998.

Wagner O. F., Christ G., Wojta J., Vierhapper H., Parzer S., Nowotny P. J., Schneider B., Waldhäusl W., Binder B. R. Polar secretion of endothelin-1 by cultured endothelial cells, *Journal of Biological Chemistry*, v. 267 (23), p. 16066-8, 1992.

Walter, L., Franklin A., Witting A., Moller T., Stella N. Astrocytes in culture produce anandamide and other acylethanolamides, *Journal of Biological Chemistry*, v. 277 (23), p. 20869-20876, 2002.

Wanecek, M., Weitzberg E. , Rudehill A., Oldner A. The endothelin system in septic and endotoxin shock, *European journal of pharmacology*, v. 407(1-2), p. 1–15, 2000.

Wang, Y., Liu Y., Ito Y., Hashiguchi T., Kitajima I., Yamakuchi M., Shimizu H., Matsuo S., Imaizumi H, Maruyama I. Simultaneous measurement of anandamide and 2-arachidonoylglycerol by polymyxin B-selective adsorption and subsequent high-performance liquid chromatography analysis: increase in endogenous cannabinoids in the sera of patients with endotoxic shock, *Analytical biochemistry*, v. 294 (1), p. 73-82, 2001.

Wotherspoon, G., Fox A., McIntyre P., Colley S., Bevan S., Winter J. *et al.* Peripheral nerve injury induces cannabinoid receptor 2 protein expression in rat sensory neurons, *Neuroscience*, v. 135 (1), p. 235-245, 2005.

Yamada, H., Kurakawa, K. Histochemical studies on endothelin and the endothelin-A receptor in the hypothalamus, *Journal of cardiovascular pharmacology*, v. 31, p. 215-18, 1998.

Yanagisawa, M., Kurihara H., Kimura S., Tomobe Y., Kobayashi M., Mitsui Y., Yazaki Y., Goto K., Masaki T. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells, *Nature*, v. 332 (6163), p. 411–415, 1988.

Yang, W.-L., Ma, G. Combined Administration of Human Ghrelin and Human Growth Hormone Attenuates Organ Injury and Improves Survival in Aged Septic Rats, *Molecular Medicine*, v. 22 (1), p. 1, 2016.

Yoshizawa, T., Shinmi O., Giaid A., Yanagisawa M., Gibson S. J., Kimura S., Uchiyama Y., Polak J. M., Masaki T. , Kanazawa I. Endothelin: A novel peptide in the posterior pituitary system, *Science*, v. 247 (4941), p. 462–464, 1990.

Zampronio, A. R., Kuzmiski J. B., Florence C. M., Mulligan S. J., Pittman Q. J. Opposing actions of endothelin-1 on glutamatergic transmission onto

vasopressin and oxytocin neurons in the supraoptic nucleus, *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, v. 30 (50), p. 16855–63, 2010.

Zampronio, A. R., Soares, D. M., Souza, G. E. P. Central mediators involved in the febrile response: effects of antipyretic drugs, *Temperature*, v. 2 (4), p. 506–521, 2015.

Zeerleder, S., Hack, C. E., Willemin, W. A. Disseminated intravascular coagulation in sepsis, *Chest*, v. 128 (4), p. 2864–75, 2005.

Zhang, L., Yao J., Wang X., Li H., Liu T., Zhao W. Poly (ADP-ribose) synthetase inhibitor has a heart protective effect in a rat model of experimental sepsis, *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, v. 8 (9), p. 9824–9835, 2015.

Zhou, L., Gao M, Xiao Z, Zhang J, Li X, Wang A Protective effect of astaxanthin against multiple organ injury in a rat model of sepsis, *Journal of Surgical Research*. Elsevier Inc, v. 195 (2), p. 559–567, 2015.

APÊNDICE 1 - SOLUÇÕES E REAGENTES

Solução mãe de PBS (salina tamponada fosfatada)

NaCl.....	80,0 g
KCl.....	2,0 g
Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O.....	14,4 g
KH ₂ PO ₄	2,0 g
Água-mili-Q.....q.s.p.	1,0 L

O pH foi acertado para 7,4, e a solução foi armazenada a 4° C.

Solução de Azul de Evans 2,5%

Azul de Evans.....	2,5 g
Salina.....q.s.p.	0,1 L

PBS para coleta do exsudato peritoneal

PBS (diluído 1:10 em água mili-Q)	1,0 L
Heparina 5 U/mL	2,0 mL
Albumina 3% (3 g de albumina/100 mL de PBS diluído).....	10,0 mL

Reagente de Griess:

Reagente 1: Sulfanilamida 1% (w/v) em H₃PO₄ 10% (v/v)

-Ácido fosfórico 10%.....	0,2 L
-Sulfanilamida (S9) A.....	2,0 g

Reagente 2: α-naftil-etilenodiamina 0,1% em água.

H ₂ O milli-Q.....	0,2 L
α -naftil (P7) F.....	0,2 g

Para o reagente de Griess, na hora do uso **misturar 1:1** do reagente 1 e do reagente 2 e usar imediatamente. O restante deve ser descartado.

Reação de Conversão: Reagente 1: Fosfato de sódio (NaH₂PO₄) 0.5 M

H ₂ O milli-q.....	0,1 L
NaH ₂ PO ₄	6,9 g

O pH foi acertado para 7,2 e a solução foi armazenada a 4° C.

Reação de Conversão: Reagente 2: Formato de amônio 2.4 M

H ₂ O milli-q	0,1 L
CH ₅ NO ₂	15,1 g

O pH foi acertado para 7,2 e a solução foi armazenada a 4° C.

Processo de desproteinização da amostra com Sulfato de zinco (ZnSO₄) 20% (p/v) em água

Água destilada.....	150 µl
ZnSO ₄	30 µl
Amostra.....	150 µl

Em um eppendorff com amostra (soro ou plasma) adicionar igual volume de água, adicionar ZnSO₄ 20% (1:10 do volume da amostra diluída ou 10% do volume da amostra diluída), agitar em vórtex, deixar em repouso por 1 h em banho de gelo 0°C, dentro da geladeira, centrifugar por 15 min, a 10.000 rpm à 4°C, e retirar o sobrenadante.

Solução veículo 1: DMSO 3,5%/Tween 80 0,2%

Salina estéril.....	9630 µl
DMSO.....	350 µl
Tween 80.....	20 µl

Solução veículo 2: DMSO 50%/Tween 80 50%

DMSO.....	50 µl
Tween 80.....	50 µl

Solução de *Escherichia coli*:

<i>E.coli</i> pura.....	500 µl
PBS.....	500 µl

Solução de Krebs - Henseleit (Regular)

NaCl – 131,3 mM.....	7,67 g
KCl – 4,7 mM.....	0,36 g
KH ₂ PO ₄ – 1,18 mM.....	0,16 g
MgSO ₄ .7H ₂ O – 1,17 mM.....	0,28 g

NaHCO ₃ – 14,9 mM.....	1,25 g
Dextrose – 5,5 mM.....	1,00 g
CaCl ₂ .2H ₂ O – 1,6 mM.....	0,23 g
EDTA – 0,03 mM	0,01 g
Água-mili-Q.....q.s.p.	1,0 L

Solução de KCl (60mM)

NaCl.....	14,70 mM
KCl.....	60,00mM
CaCl ₂ .2H ₂ O.....	1,60 mM
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	1,17 mM
KH ₂ PO ₄	1,18 mM
NaHCO ₃	14,90 mM
Glicose.....	5,50 mM
EDTA.....	0,01 mM

APÊNDICE 2 - SOFA

SOFA	0	+1	+2	+3	+4
Sistema Neurológico de Glasgow	15	13-14	10-12	6-9	< 6
Sistema respiratório PaO ₂ /FiO ₂ (mmHg)	> 400	< 400	< 300	< 200 e VM	< 100 e VM
Sistema gastrointestinal Bilirrubinas (mg/dL)	< 1,2	1,2-1,9	2,0-5,9	6-11,9	> 12
Sistema cardiovascular PAM	sem hipotensão	PAM < 70 mmHg	dopamina ≤ 5 OU dobutamina (qualquer dose)	dopamina > 5 OU epinefrina ≤ 0,1 OU norepinefrina ≤ 0,1	dopaminas > 15 OU epinefrina > 0,1 OU norepinefrina > 0,1
Dose de vasopressor (µg/kg/min)					
Sistema de coagulação Contagem de plaquetas	≥ 150	< 150	< 100	< 50	< 20
Sistema renal Creatinina (mg/dL) ou débito urinário	< 1,2	1,2-1,9	2,0-3,4	3,5-4,9 OU (< 500 mL/d)	> 5,0 OU (< 200 mL/d)

PAM, pressão arterial média; VM, ventilação mecânica; PaO₂, pressão parcial arterial de oxigênio; FiO₂, fração inspirada de oxigênio

FONTE: MORAES et al., 2014.